

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
am Campus Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Glykosyltransferasen als Marker der frühen Tumorgenese –
Immunhistochemische Färbungen an Mammakarzinompräparaten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Friederike Liesche

aus

Dessau-Roßlau

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Oliver J. Stoetzer Prof. Dr. Doris Mayr
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Dr. h.c. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.06.2017

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Das Mammakarzinom	4
2.1.1	Epidemiologie	4
2.1.2	Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms	4
2.1.3	Tumorcharakteristika als prognostische und prädiktive Faktoren	7
2.1.4	Früherkennung, Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge	17
2.2	Ansatz dieser Forschungsarbeit – Die Glykosylierung und ihre Glykosyltransferasen.....	22
2.2.1	N-Acetylgalaktosaminyltransferase 6 (GALNT6)	25
2.2.2	β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 2 (GCNT2).....	26
2.2.3	St6(α -N-Acetylneuraminy-2,3- β -galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosamin- α -2,6-sialyltransferase I (St6GalNAc I)	26
2.3	Methodischer Ansatz dieser Forschungsarbeit – Die Immunhistochemie.....	28
2.3.1	Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung	28
2.3.2	Auswertung nach IRS	29
2.4	Zielsetzung dieser Forschungsarbeit	31
3	Material und Methoden	32
3.1	Materialien	32
3.1.1	Tumorpräparate für Untersuchungen an Primärtumorgewebe (Kollektiv 1).....	32
3.1.2	Tumorpräparate zum Vergleich von Primärtumor und dessen Absiedlungen (Kollektiv 2)	38
3.1.3	Antikörper	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Aufarbeitung der Gewebeproben	40
3.2.2	Die immunhistochemische Färbung	42
3.2.3	Kontrollen	45
3.2.4	Mikroskopie	48
3.2.5	Statistische Auswertung	51

4	Ergebnisse.....	53
4.1	Untersuchungen an Primärtumorgewebe (Kollektiv 1)	53
4.1.1	Histologie.....	53
4.1.2	Differenzierungsgrad	55
4.1.3	Tumorausdehnung.....	57
4.1.4	Nodalstatus.....	59
4.1.5	Metastasenstatus	60
4.1.6	Hormonrezeptorstatus.....	61
4.1.7	Her2-Status	65
4.1.8	Her4- und pHer4-Status.....	67
4.1.9	Überleben	71
4.2	Vergleich von Primärtumor und dessen Absiedlungen (Kollektiv 2)	73
5	Diskussion.....	76
5.1	Kollektiv 1: Glykosyltransferasen und ihre Bedeutung für die Tumorcharakterisierung ..	76
5.2	Kollektiv 2: GALNT6 – Vergleich von Primärtumor- mit Metastasen- bzw. Rezidivgewebe	79
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	80
6	Zusammenfassung.....	81
7	Anhang.....	83
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	83
7.2	Bezugsquellenverzeichnis.....	85
7.3	Tabellenverzeichnis	87
7.4	Abbildungsverzeichnis.....	88
8	Literaturverzeichnis	90
9	Danksagung.....	98
10	Lebenslauf.....	99
11	Eidesstattliche Versicherung	100

2 Einleitung

Schon in dreieinhalbtausend Jahre alten Aufzeichnungen des antiken Ägyptens findet man Beschreibungen von Tumoren. In dem sogenannten „Edwin Smith Papyrus“ werden acht Fälle von Tumoren oder Ulzerationen der Brust mitsamt ihrer Entfernung durch Kauterisation geschildert. Daneben lautet eine Inschrift über diese Erkrankung übersetzt: „Es gibt keine Behandlung“(1). Glücklicherweise trifft diese Aussage heutzutage dank des medizinischen Fortschrittes nur noch auf einen Teil der betroffenen Patientinnen zu. In vielen Fällen können Brustkrebspatientinnen angemessen behandelt, zum Teil sogar geheilt werden. Dennoch stellen Krebserkrankungen auch heute noch in Deutschland nach Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Von daher wird intensiv nach neuen Ansatzpunkte zur Therapie von Malignomen wie dem Mammakarzinom gesucht. Hierzu ist eine detaillierte Charakterisierung der Tumorzellen von essenzieller Bedeutung, um onkogenetische Prozesse besser verstehen und ihnen gegebenenfalls therapeutisch zu begegnen. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit soll ein weiteres Puzzleteil für das immens große Bild der Charakterisierung des Mammakarzinoms untersucht werden. Sie beleuchtet den Zusammenhang von Enzymen, die für die Glykosylierung von Zelloberflächenmolekülen verantwortlich sind, mit Tumorstaging, -grading und weiteren bereits etablierten Charakteristika des Mammakarzinoms.

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau und nach Lungenkrebs die zweithäufigste durch Krebs hervorgerufene Todesursache. Laut Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und dem Robert Koch Institut erkranken in Deutschland jährlich ungefähr 70.000 Frauen an Brustkrebs. Mit einem prozentualen Anteil von 31,3 an allen Tumorlokalisationen führt das Mammakarzinom damit deutlich die Liste der häufigsten Krebserkrankungen der Frau an. Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, wobei dieser im Durchschnitt fünf Jahre früher auftritt als die meisten onkologischen Erkrankungen des Erwachsenenalters; jede vierte betroffene Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, jede zehnte sogar unter 45 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (2, 3).

Obwohl die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland seit 1980 eine steigende Tendenz zeigt, nimmt die Mortalität seit 1990 deutlich ab (4). In den USA wird seit Ende der 1980er Jahre ein Rückgang der Mortalität von über 20 Prozent beobachtet. Hierbei wird ein Zusammenhang mit der verbesserten Früherkennung und der adjuvanten systemischen Therapie diskutiert (5). Trotzdem stellt das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache dar (4). Im Jahr 2012 verstarben in der Bundesrepublik 17.748 Frauen infolge einer bösartigen Veränderung der Brustdrüse. Das sind 3,9 Prozent aller Todesfälle des weiblichen Geschlechts (6).

2.1.2 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms

Die Ätiologie vieler bösartiger Neubildungen hängt nicht von einem Faktor ab, sondern ist multifaktoriell. Dies gilt auch für das Mammakarzinom. Als ausschlaggebende endogene Risikofaktoren wurden unter anderem das Alter, die familiäre Prädisposition, hormonelle Faktoren und das Vorhandensein von benignen Veränderungen der Brustdrüse identifiziert. Doch auch exogenen Faktoren darf eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs eingeräumt werden. So können ein ungesunder Lebensstil, insbesondere Genussmittel wie Alkohol und Nikotin, und bestimmte Umweltfaktoren wie ionisierende Strahlung das Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs erhöhen (7, 8).

Trotz der vielen bekannten Risikofaktoren ist die Suche nach weiteren beeinflussenden Umständen nicht beendet, denn ungefähr 66 Prozent der Frauen mit einer malignen Veränderung der Brustdrüse weisen keine der bisher bekannten Risikofaktoren auf (9).

Das Risiko Brustkrebs zu entwickeln steigt mit dem Alter. Sowohl bei der Zahl der Neuerkrankungen als auch bei der Sterblichkeit zeigt sich eine deutliche Altersabhängigkeit. Während beispielsweise in der Gruppe von 35- bis 39-jährigen Frauen ungefähr 60 von 100.000 an Brustkrebs erkranken, sind es bei den 65- bis 69-jährigen circa 430 von 100.000 Frauen (2).

Dass genetische Faktoren großen Einfluss auf die Entstehung von malignen Veränderungen haben, ist unumstritten. Dennoch muss unterschieden werden zwischen dem erhöhten Aufkommen von Brustkrebsfällen in einer Familie durch unspezifische genetische Mutationen und dem eigentlichen familiären Mammakarzinom, bei dem definierte Veränderungen in spezifischen Genen vorliegen (7). Bei circa 15 Prozent der Mammakarzinompatientinnen liegt eine positive Familienanamnese für Brustkrebs vor. Ist eine Verwandte ersten Grades wie Mutter, Schwester oder Tochter von Brustkrebs betroffen, so erhöht sich das Risiko auf das Zweifache an Brustkrebs zu erkranken. Das Risiko erhöht sich sogar auf das Vier- bis Sechsfache, wenn zwei Verwandte ersten Grades betroffen sind. Für eine Frau, deren Schwester vor dem 50. Lebensjahr ein bilaterales Mammakarzinom entwickelt hat, liegt das Lebenszeitrisko bei über 50 Prozent (9). Nur circa fünf bis zehn Prozent der Mammakarzinome sind vererbt und damit auf eine spezifische Genmutation zurückzuführen. Die familiären Mammakarzinome werden autosomal-dominant vererbt, neigen zu einer hohen Penetranz und treten meist bilateral auf. Die am besten charakterisierten Mutationen betreffen das BRCA1- und BRCA2-Gen und machen ungefähr die Hälfte der erblichen Mammakarzinome aus. Hierbei handelt es sich um Tumorsuppressorgene, die im Falle einer Mutation mit einem höheren Risiko sowohl für Mamma- als auch Ovarialkarzinome assoziiert sind. BRCA1 und BRCA2 kodieren für Proteine, die entscheidend an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Man geht von einem Risiko von 65 Prozent aus, bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, wenn eine Mutation im BRCA1-Gen vorliegt; von 45 Prozent bei Vorhandensein einer Veränderung im BRCA2-Gen. Es gibt jeweils mehr als 500 bekannte Mutationen der BRCA1- und BRCA2-Gene, wobei Hinweise vorliegen, dass

der Ort der Mutation das Krankheitsmuster beeinflussen kann (10). Es sind weitere Gene bekannt, bei deren Mutation ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs gegeben ist. So ist beispielsweise bei dem Li-Fraumeni-Syndrom eine Veränderung in dem Tumorsuppressorgen p53 gegeben. Bei diesem seltenen Syndrom kann es bereits im Kindesalter zur Entstehung von Mammakarzinomen kommen. Weitere Gene, bei deren Mutationen ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs vorliegt, sind zum Beispiel das STK11-, das PTEN- und das MSH2-Gen (11).

Der Hormonhaushalt einer Frau verändert sich mehrfach im Laufe ihres Lebens. Sowohl physiologische als auch pathologische Veränderungen begünstigen oder aber erschweren die Tumorgenese. Während ihrer geschlechtsreifen Phase produziert die Frau in ihren Ovarien Steroidhormone, welche direkt die Entwicklung und Funktion der Brustdrüse beeinflussen. Generell sind kontinuierliche menstruale Zyklen ohne Gravidität über einen langen Zeitraum risikoerhöhend. So hat sich in weltweiten epidemiologischen Studien gezeigt, dass eine frühe Menarche und eine späte Menopause, genauso wie Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei Erstgebärenden eine signifikante Risikoerhöhung mit sich bringen. Frauen, die ihr erstes Kind nach dem 30. Lebensjahr gebären, haben ein zweifach erhöhtes Mammakarzinomrisiko gegenüber Frauen, die ihr erstes Kind schon mit 20 Jahren gebären. Multiparität und Stillen bis zu einem halben Jahr wirken hingegen eher protektiv (12, 13). Auch von außen herbeigeführte Hormone im Sinne einer Hormonersatztherapie beeinflussen das Brustkrebsrisiko. Studien zeigten, dass eine Therapie mit Östrogen über einen Zeitraum von länger als fünf Jahren das Brustkrebsrisiko um 35 Prozent steigert (14). Zudem scheint eine Kombinationstherapie mit Östrogen und einem Progesteron ein höheres Risiko vorzuweisen als eine alleinige Östrogentherapie (15).

Bereits vorhandene Veränderungen der Brustdrüse, wenn auch gutartig, können das Mammakarzinomrisiko steigern, indem sie die radiographische Vorsorge erschweren. So zeigte sich in Studien, dass Frauen mit hoher Dichte der Mamma ein vierfach erhöhtes Risiko für Brustkrebs aufweisen (16).

Jede Frau kann selbst dazu beitragen, ihr individuelles Mammakarzinomrisiko möglichst niedrig zu halten, denn auch die Lebensführung nimmt Einfluss auf die Tumorgenese. Fettleibigkeit, ungenügende Bewegung, erhöhter Alkohol- und Nikotinabusus tragen hier zu einem Risikoanstieg bei (17-19). Im Gegensatz dazu wirken

regelmäßige körperliche Aktivität und bewusste Ernährung, wie beispielsweise eine mediterrane Diät protektiv (20, 21).

2.1.3 Tumorcharakteristika als prognostische und prädiktive Faktoren

Zur Planung des Therapieverlaufes ist eine zuverlässige Abschätzung des individuellen Risikos der einzelnen Patientin eine wichtige Voraussetzung, um eine individualisierte Behandlung zu ermöglichen und sowohl eine Über- als auch eine Untertherapie mit potenziell toxischen Substanzen zu vermeiden. Prognosefaktoren geben zum Zeitpunkt der Primärdiagnose darüber Aufschluss, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Erkrankung später in Form eines Rezidivs oder einer Metastase wieder auftritt oder der Tod durch die Erkrankung eintritt. Zum Zeitpunkt der Primärbehandlung können sie Informationen über die Aggressivität des Tumors und damit verbundenen Risiken für die Patienten liefern. Unter prädiktiven Faktoren versteht man therapierelevante Faktoren, die eine Resistenz oder Sensitivität des Tumors auf eine jeweilige Therapie anzeigen (8).

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft besteht kein Zweifel mehr, dass sich das invasive Mammakarzinom aus intraepithelialen, präinvasiven Vorstufen, sogenannten Carcinomata in situ, entwickelt. Als Vorläuferläsion ist das Carcinoma in situ durch eine intakte Basalmembran gekennzeichnet, die es vom gefäßführenden Fett- und Bindegewebe abgrenzt. Es lassen sich das duktales (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) unterscheiden. Mit wenigen Ausnahmen entstehen die Karzinome im Epithel der terminalen duktulo-lobulären Einheit, also dem Übergang vom Lobus zum Ductus. Dies gilt sowohl für die lobulären als auch die duktales Karzinome. Der Unterschied zwischen diesen beiden Formen ergibt sich somit nicht aus verschiedenen Entstehungsorten, sondern aus dem Funktionsverlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, das, wenn es intakt ist, für ein kohäsives Wachstum verantwortlich ist, bei seinem Fehlen jedoch zu einem dissoziierenden Wachstum führt. Dank der Verbesserung der radiologischen Diagnostik haben die intraepithelialen Neoplasien zahlenmäßig zugenommen und machen bereits 20 Prozent aller Karzinome aus. Aufgrund ihres hohen Potenzials zur Entartung müssen sie entfernt werden. Durchdringt der Tumor die Basalmembran, wächst er also infiltrativ und hat das Potential zur hämatogen oder lymphogenen Metastasierung, handelt es sich um ein invasives Mammakarzinom (22, 23).

In etwa 50 Prozent der Fälle ist der obere äußere Quadrant der Brust vom Tumor befallen. Die übrigen Quadranten weisen mit jeweils 10 Prozent und die retromamilläre Zentralregion in 20 Prozent den Sitz des Karzinoms auf. Makroskopisch liegt typischerweise ein strahlig begrenzter derber Knoten weißlicher Farbe, eventuell mit gelben Stippchen vor (23). (**Abb. 1 & 2**)

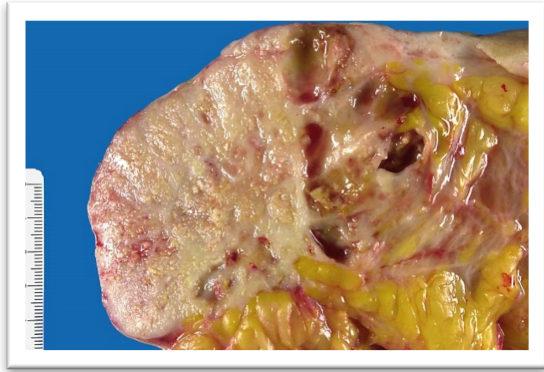


Abb. 1: Invasives duktales Mammakarzinom
(© PathoPic)



Abb. 2: Lobuläres Mammakarzinom
(©PathoPic)

Es existieren zahlreiche histologische Einteilungen des Mammakarzinoms. Eine weit verbreitete Klassifikation wurde in ihrer vierten Auflage im Jahr 2012 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgestellt (**Tab. 1**). Diese Klassifikation stellt den morphologischen Phänotypus der Karzinome in den Vordergrund, integriert gleichzeitig jedoch neue molekulare und genetische Erkenntnisse (24).

Histologischer Typ
<i>Invasives Karzinom, kein spezieller Typ („no special type“, NST)</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Pleomorphes Karzinom – Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen – Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen – Karzinom mit melanotischen Merkmalen
<i>Invasives lobuläres Karzinom</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Klassisches lobuläres Karzinom – Solides lobuläres Karzinom – Alveoläres lobuläres Karzinom – Pleomorphes lobuläres Karzinom – Tubulolobuläres Karzinom – Gemischtes lobuläres Karzinom
<i>Tubuläres Karzinom</i>
<i>Kribriiformes Karzinom</i>
<i>Muzinöses Karzinom</i>
<i>Karzinom mit medullären Eigenschaften</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Medulläres Karzinom – Atypisches medulläres Karzinom – Invasives Karzinom NST mit medullären Eigenschaften
<i>Karzinom mit apokriner Differenzierung</i>
<i>Karzinom mit siegelringzelliger Differenzierung</i>
<i>Invasives mikropapilläres Karzinom</i>
<i>Metaplastisches Karzinom, kein spezieller Typ</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Adenosquamöses Karzinom – Fibromatoseähnliches metaplastisches Karzinom – Plattenepithelkarzinom – Spindelzellkarzinom – Metaplastisches Karzinom mit mesenchymaler Differenzierung – Gemischtes metaplastisches Karzinom – Myoepitheliales Karzinom
<i>Karzinome mit neuroendokrinen Eigenschaften</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Neuroendokriner Tumor, gut differenziert – Neuroendokrines Karzinom, schlecht differenziert (kleinzelliges Karzinom) – Karzinom mit neuroendokriner Differenzierung
<i>Sekretorisches Karzinom</i>
<i>Invasives papilläres Karzinom</i>
<i>Azinuszellkarzinom</i>
<i>Mukoepidermoides Karzinom</i>
<i>Polymorphes Karzinom</i>

Tab. 1: Die aktuelle WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome (Adaptiert nach (25))

Als häufigster histologischer Subtyp liegt zu 50 bis 80 Prozent aller Mammakarzinome das „invasive Karzinom, kein spezieller Typ (NST)“ vor. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Tumoren, deren gemeinsames Merkmal es ist, dass sie keine ausreichenden Charakteristika ausbilden, um einem speziellen Typ zugeordnet zu

werden (24). In älteren Auflagen der WHO-Klassifikation war diese Gruppe mit der Definition des invasiven duktales Mammakarzinoms „not otherwise specified (NOS)“ zusammengefasst worden (26). Da jedoch weder eine bewiesene Histogenese vorliegt, es sich noch um eine homogene Gruppe von Karzinomen handelt, wurde der Terminus „duktal“ gestrichen. Trotzdem sind die Bezeichnungen „invasives duktales Karzinom“ und „duktales Karzinom NOS“ weiterhin als terminologische Alternativen akzeptiert (24). Das Karzinom vom NST-Typ ist gekennzeichnet durch ein kohäsives Zellwachstum und ein unspezifisches Differenzierungsmuster, das in über 50 Prozent des Gesamttumors nachweisbar ist. In über 80 Prozent lässt sich eine In-situ-Komponente nachweisen (22). **(Abb. 3 & 4)**

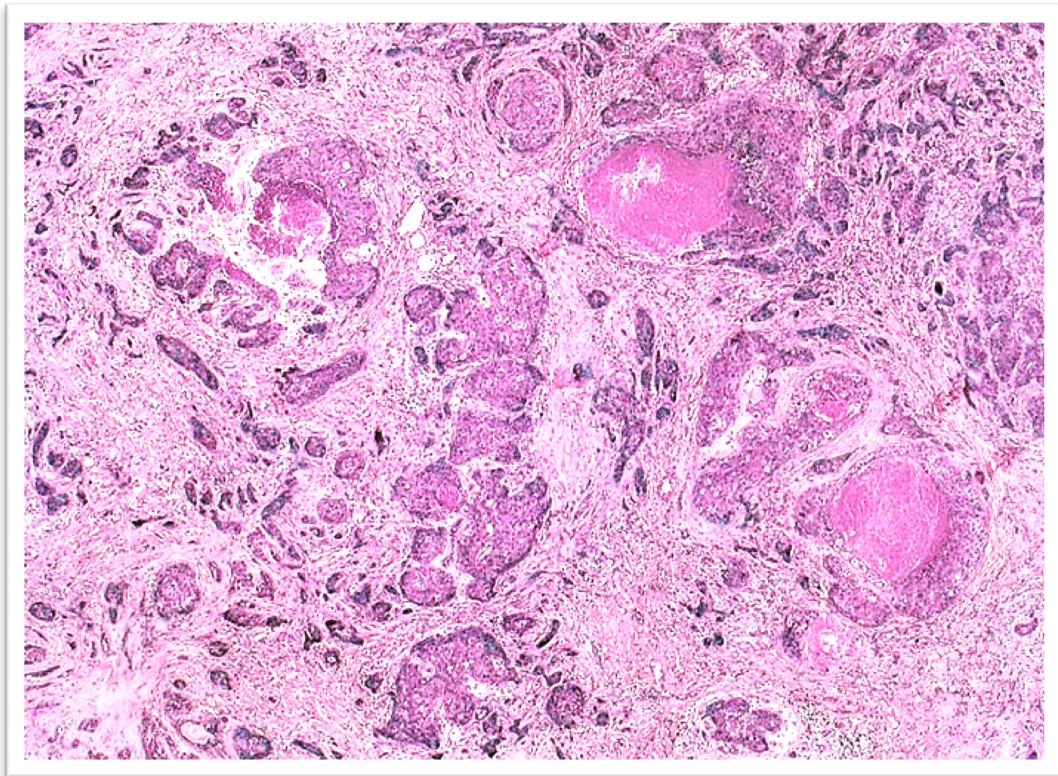


Abb. 3: Wenig differenziertes invasives duktales Mammakarzinom (© *PathoPic*)

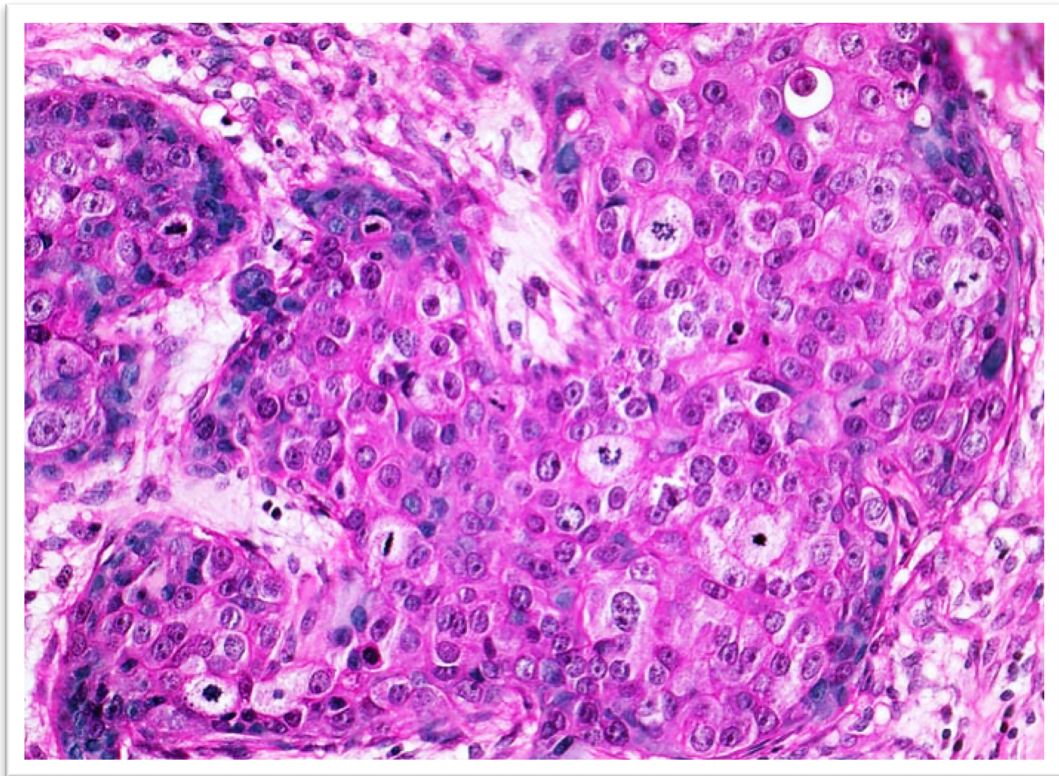


Abb. 4: Wenig differenziertes invasives duktales Mammakarzinom (© *PathoPic*)

Das invasive lobuläre Karzinom (ILC) macht etwa 5 bis 15 Prozent der invasiven Mammakarzinome aus. Dessen klassisches Erscheinungsbild ist durch seine Kleinzelligkeit und sein dissoziiertes, infiltrierendes Wachstum mit fehlender Adhäsion zwischen den Tumorzellen und lineare Anordnung der Zellen gekennzeichnet (7, 24).
(Abb. 5)

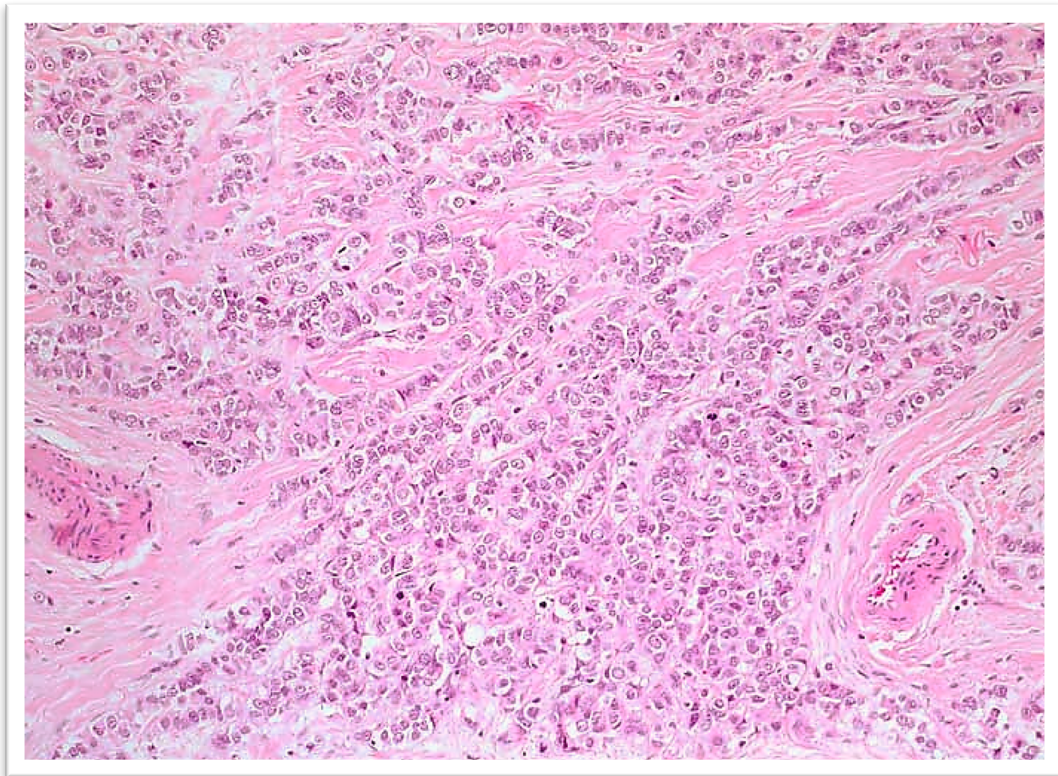


Abb. 5: Invasives lobuläres Mammakarzinom (© PathoPic)

Beim Vergleich der Langzeitprognose von ILC und NST-Karzinomen zeigt sich ein geringeres Progressionsrisiko auf Seiten des ILC in den ersten Jahren, aber ein Überschneiden der Überlebenskurven nach circa 10 Jahren mit einem schlechteren Langzeitüberleben der ILC (27, 28). Die übrigen histologischen Subtypen des invasiven Mammakarzinoms sind mit etwa zwei bis vier Prozent sehr selten. Unterschiede in Therapie und Prognose fordern hier jedoch eine gründliche histologische Differenzierung. Eine besondere Manifestationsform stellt das inflammatorische Mammakarzinom dar. Dieses ist vielmehr durch seine klinische Präsentation mit Erythem, Ödem und Peau d'Orange als durch spezifische histologische Merkmale gekennzeichnet. Da diese Tumorentität meist mit einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium einhergeht, ist die Prognose dementsprechend sehr schlecht (22).

Neben der histologischen Klassifikation des Mammakarzinoms ist die Stadieneinteilung mit Hilfe von Stagingfaktoren, zu denen die Tumorgroße, der Nodalstatus und das Vorhandensein von Fernmetastasen gehören, von außerordentlicher prognostischer Bedeutung (**Tab. 2**). Fernmetastasen, beschrieben durch das

M-Stadium, besitzen hierbei die stärkste prognostische Aussage, da sie zu einem derart geringen Gesamtüberleben führen, dass damit die Erkrankung derzeit noch als nicht heilbar eingeordnet werden muss. Die häufigsten hämatogenen Metastasen werden im Skelettsystem (70%), in der Lunge (60%), der Leber (50%) und dem Gehirn gefunden. Der Nachweis von Fernmetastasen bedeutet unabhängig von den übrigen Stagingfaktoren eine Einordnung in das UICC-Stadium IV, welches eine Brustkrebserkrankung in der palliativen Situation kennzeichnet. Die Internationale Vereinigung gegen Krebs (französisch: Union internationale contre la cancer) hat diese klinische Stadieneinteilung basierend auf 30 Kombinationen der Kategorien pT, pN und M entwickelt (**Tab. 3**). Das pT-Stadium beschreibt hierbei nach histopathologischer Beurteilung des Operationsresektates die Größen- beziehungsweise Tiefenausdehnung des Tumors in das umliegende Gewebe. Zur Bewertung des pN-Stadiums ist die Resektion und histologische Untersuchung zumindest der unteren axillären Lymphknoten aus dem sogenannten Level I notwendig. Als Sentinel- oder Wächter-Lymphknoten wird der erste in einem Lymphabfluss befindliche Lymphknoten bezeichnet. Ist dieser histologisch tumorfrei, verzichtet man auf die weitere axilläre Lymphknotenentfernung. Beim Fehlen von Lymphknotenmetastasen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 80 Prozent, bei Befall von mehr als vier Lymphknoten dagegen nur 20 Prozent (23, 29-31).

T (Tumorausdehnung)		N (befallene Lymphknoten (LK))		M (Fernmetastasen)	
<i>TX</i>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	<i>NX</i>	Beurteilung der regionären LK nicht möglich	<i>MX</i>	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<i>T0</i>	kein Tumor	<i>N0</i>	keine	<i>M0</i>	keine
<i>Tis</i>	Carcinoma in situ	<i>N1mi</i>	Mikrometastasen < 0,2 cm	<i>M1</i>	Fernmetastasen vorhanden
<i>T1</i>	≤ 2 cm	<i>N1</i>	1-3 ipsilaterale LK axillär		
<i>T1mi</i>	Mikroinvasion ≤ 0,1 cm	<i>N2</i>	4-9 ipsilaterale LK axillär		
<i>T1a</i>	> 0,1 – 0,5 cm	<i>N3</i>	≥ 10 ipsilaterale LK axillär/infraklavikulär		
<i>T1b</i>	> 0,5 – 1,0 cm				
<i>T1c</i>	> 1,0 – 2,0 cm				
<i>T2</i>	> 2,0 – 5,0 cm				
<i>T3</i>	> 5,0 cm				
<i>T4</i>	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand und Haut				

Tab. 2: TNM-Klassifikation von Tumoren (nach (31))

UICC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
<i>0</i>	<i>Tis</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>IA</i>	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>IB</i>	<i>T0, T1</i>	<i>N1mi</i>	<i>M0</i>
<i>IIA</i>	<i>T0, T1</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>IIB</i>	<i>T2</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>IIIA</i>	<i>T0, T1, T2</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
	<i>T3</i>	<i>N1, N2</i>	<i>M0</i>
<i>IIIB</i>	<i>T4</i>	<i>N0, N1, N2</i>	<i>M0</i>
<i>IIIC</i>	jedes T	<i>N3</i>	<i>M0</i>
<i>IV</i>	jedes T	jedes N	<i>M1</i>

Tab. 3: UICC-Stadieneinteilung (nach (31))

Ein weiterer entscheidender Prognosefaktor ist der histologische Differenzierungsgrad. Das histologische Grading erfolgt nach einer Modifikation des von Bloom und Richardson vorgeschlagenen Systems entsprechend Elston und Ellis in drei Differenzierungs- oder auch Malignitätsgrade. Die Zuordnung zu dem entsprechenden Differenzierungsgrad erfolgt hierbei anhand von drei Kriterien, der Tubulusbildung, der Kernpolymorphie und der Mitoserate. Für jedes Kriterium können ein bis maximal drei Punkte vergeben werden, aus denen anschließend die Summe gebildet wird. Je höher die erreichte Scoresumme, desto höher ist das Grading und damit die Entdifferenzierung (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = schlecht differenziert). Der Differenzierungsgrad stellt darüber hinaus einen wertvollen prädiktiven Faktor für das Ansprechen einer Chemotherapie dar. So sprechen G3-Tumoren besser auf eine adjuvante oder neoadjuvante Therapie an als G1-Tumoren. Trotzdem ist die Prognose von G2- oder G3-Tumoren schlechter als die eines G1-Tumors, da mit der histologischen Entdifferenzierung die Malignität des Tumors steigt (8, 32).

Tumoren werden durch weitere Merkmale wie beispielsweise Zelloberflächenstrukturen charakterisiert, von denen bestimmte als Prognosefaktoren gelten und den Therapieverlauf stark beeinflussen können. Für das Mammakarzinom sind die Ausbildung von Hormonrezeptoren, sowie die Expression des Her2/neu-Rezeptors von starker Bedeutung, weswegen deren Nachweis heutzutage standardmäßig durchgeführt wird. Der Hormonrezeptorstatus beschreibt die qualitative und quantitative Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf den Tumorzellen; er wird immunhistochemisch bestimmt und mithilfe des Immunreaktiven Scores (IRS, siehe 2.3.2) angegeben. Ein positiver Hormonrezeptorstatus, der definitionsgemäß ab einem IRS von 3 vorliegt, ist mit einer hohen Differenzierung des Tumorgewebes assoziiert, das heißt eine Ähnlichkeit zum gesunden Brustgewebe ist noch ansatzweise gegeben. Außerdem können die entsprechenden Tumoren über ihre Rezeptoren therapeutisch hormonell beeinflusst und am weiteren Wachstum gehemmt werden. Aus diesen Gründen haben solche Karzinome eine insgesamt günstigere Prognose. Her2/neu ist das Gen, das für einen Rezeptor aus der Familie der Epidermal Growth Factor Receptors (EGF-Rezeptoren) kodiert. Über den RAS-MAP-Kinase-Pathway stimulieren sie bei Aktivierung die Zellproliferation und hemmen gleichzeitig über den mTOR-Pathway die Apoptose. Damit wachsen Tumoren mit einer

Amplifikation des Her2/neu-Gens generell aggressiver. Darüber hinaus sind sie mit Hormonrezeptornegativität und geringer Differenzierung assoziiert. Seit der Zulassung von Trastuzumab, ein gegen den Her2/neu-Rezeptor gerichteter Antikörper, kommt der Bestimmung des Her2-Status eine zentrale Bedeutung zu (22, 33, 34). Nur solche Karzinome, die entweder den Rezeptor überexprimieren oder eine Amplifikation des Gens aufweisen, sind demnach für eine Anti-Her2-Therapie geeignet (35). Zur Bestimmung des Her2-Status stehen verschiedene Testplattformen zur Verfügung. An Formalin-fixiertem Gewebe sind derzeit der immunhistochemische Rezeptornachweis und der Nachweis der Genamplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH-Test) am gebräuchlichsten. Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung wird ein Immuno-Score bestimmt, der von negativ (Score 0 und 1+), über grenzwertig (Score 2+, **Abb. 6**) bis positiv (3+, **Abb. 7**) reicht und auf einer Kombination aus Intensitäts-Scoring und dem Nachweis einer ringförmig ausgebildeten Färbung beruht (22).

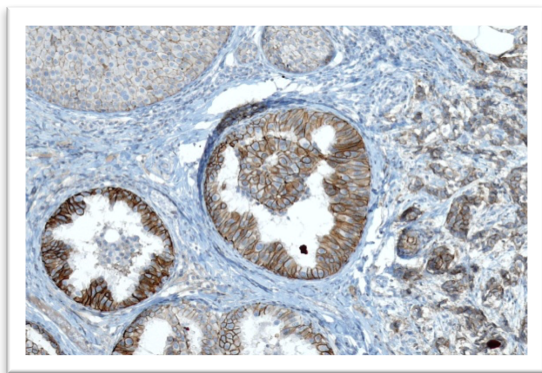


Abb. 6: Invasiv duktales Mammakarzinom, Her2-Score 2+ (©PathoPic)

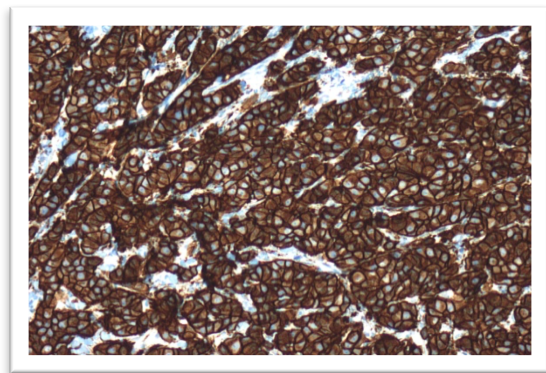


Abb. 7: Invasiv duktales Mammakarzinom, Her2-Score 3+ (©PathoPic)

Liegt ein Score 2+ vor, sollte eine Nachuntersuchung mit Hilfe des FisH-Tests durchgeführt werden (36). Mithilfe der Bestimmung von Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status können Mammakarzinome in fünf intrinsische Subtypen unterteilt werden. Dieses Klassifikationsprinzip ist allem voran auf therapeutische Konsequenzen ausgerichtet. Luminal-A- und -B-Typen sind hierbei Hormonrezeptor-positiv, unterscheiden sich klinisch gesehen allerdings in ihrem Rezidiv- und Metastasierungsrisiko, welches durch die immunhistochemische Bestimmung des Proliferationsfaktors Ki-67 eingeschätzt werden kann. Luminal-B-Typen können

entweder Her2-positiv oder –negativ sein. Der Her2-Typ zeichnet sich durch eine Überexpression von Her2-Rezeptoren bei negativem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus aus. Bei negativem Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status spricht man von einem sogenannten Basal-like-Typ (37). Das oben bereits angesprochene Proliferationsprotein Ki-67 markiert ausschließlich Zellen, die sich in einer aktiven Phase des Zellzyklus, sprich G₁-, S-, G₂-Phase oder Mitose befinden und kann so nach immunhistochemischer Anfärbung einen Hinweis auf die zu erwartende Aggressivität des Tumors und damit dessen Prognose geben (38).

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Lymphknotenbefall dient die Bestimmung des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA) und dessen Inhibitors PAI-1 (Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1) als weiteres prognostisches Hilfsmittel. Erhöhte Werte von uPA korrelieren hierbei mit dem Auftreten früher Rezidive in den ersten 24 Monaten postoperativ und legen eine Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie nahe. Interessanterweise zeigen auch hohe Werte des PAI-1 eine schlechte Prognose an und nicht wie anfänglich zu erwarten eine protektive Wirkung. Sind niedrige Werte von uPA und PAI-1 nachzuweisen, darf von einer Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit von unter 10 Prozent ausgegangen werden. Diesen Patientinnen kann eine adjuvante Chemotherapie erspart bleiben (8, 39).

2.1.4 Früherkennung, Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge

Für die meisten Tumorerkrankungen gilt: Je früher der Tumor erkannt wird, desto günstiger sind die Heilungschancen. Hierin stellt der Brustkrebs keine Ausnahme dar. Eine Entdeckung des Tumors bereits im Frühstadium führt oftmals zu einer weniger ausgedehnten Operation, geringerer konsekutiver Strahlenbelastung und bei günstiger Tumorbilogie zu einer weniger ausgeprägten medikamentösen Therapie.

Die einzige Früherkennungsmethode, die in großen randomisierten Studien eine Senkung der Mammakarzinommortalität ergeben hat, ist die Brustdiagnostik mit Mammographie, gegebenenfalls in Kombination mit Sonographie und ergänzt durch ein Mamma-MRT. In Deutschland ist inzwischen ein flächendeckendes, qualitätsgesichertes Screeningprogramm etabliert worden. Alle Frauen zwischen 50 und 69 Jahren haben Anspruch auf eine kostenlose Screening-Mammographie. Sie wird alle zwei Jahre an hierfür zertifizierten Instituten durchgeführt. Bei familiärem Risiko

besteht Anspruch auf eine jährliche Mammographie. Mit Hilfe der Mammographie können direkte Malignitätskriterien, wie Herdbefunde und Mikrokalzifikationen, und indirekte Malignitätskriterien wie beispielsweise Veränderungen der Drüsenarchitektur oder Dichte, Asymmetrie der Mammæ oder Vergrößerung eines Ganges oder Gefäßes, festgestellt werden. Die Beurteilung erfolgt nach der BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System)-Klassifikation. Die Verlässlichkeit der Mammographie beim Malignomausschluss hängt jedoch stark von der Brustdichte ab. Sie ist im fettreichen Gewebe mit bis zu 100 Prozent am höchsten und nimmt mit zunehmender Brustdichte auf 50 bis 60 Prozent ab. Trotz des weit verbreiteten Screening-Programms werden in Deutschland mehr als 70 Prozent der Mammakarzinome von den Frauen selbst ertastet. Die Selbstuntersuchung der Brust, die die Inspektion und Palpation umfassen sollte, ist eine wichtige Ergänzung der Früherkennung. In großen Studien konnte jedoch keine Mortalitätssenkung durch sie allein festgestellt werden. Klinisches Leitsymptom ist ein tastbarer Knoten in der Brust, aber auch andere neu aufgetretene Beschwerden oder Veränderungen an der Brust können durch ein Mammakarzinom bedingt sein. So können beispielsweise Größen- oder Formveränderungen, entzündliche oder ekzemartige Erscheinungen, Mamillenretraktion oder –sekretion, Hautveränderungen, axilläre Lymphknotenschwellung oder selten auch lokalisierte Schmerzen auf ein malignes Geschehen hinweisen (40).

Bei allen symptomatischen Befunden sowie bei klinisch okkulten, mammographisch suspekten Herden ist eine histologische Sicherung mittels minimalinvasiver Diagnostik in Form einer Biopsie anzustreben. Hierfür wird bei tastbaren oder sonographisch darstellbaren Läsionen eine Stanzbiopsie unter sonographischer Kontrolle durchgeführt. Nicht palpable Läsionen sollten unter mammographischer Kontrolle perkutan biopsiert werden. Zum histopathologischen Routinebefund gehören die in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Tumorcharakteristika, wie die Tumorausdehnung, Befall axillärer Lymphknoten, der Differenzierungsgrad, der Steroidhormonrezeptor- und der Her2/neu-Status. Neben der histopathologischen Untersuchung sind bei ungünstiger Tumorbilogie Staginguntersuchungen zum Ausschluss von Fernmetastasen sinnvoll. Diese beinhalten neben der gynäkologischen Untersuchung CT-Aufnahmen des Thorax und Abdomens (oder gegebenenfalls eine Röntgenaufnahme des Thorax, sowie eine Leber-sonographie) und ein Knochenszintigramm (40).

Die Behandlung des primären Mammakarzinoms setzt eine enge Kooperation verschiedener Fachdisziplinen voraus, um optimale Therapieerfolge zu erzielen. Zur lokalen Tumorkontrolle im Bereich der Brust und der Lymphabflusswege soll die operative Therapie dienen. Strahlentherapie und systemische Behandlung stellen weitere Pfeiler der interdisziplinären Behandlung dar. Die operative Entfernung des invasiven Mammakarzinoms hat einen umfassenden Wandel von ultraradikalen Vorgehensweisen hin zu brusterhaltenden schonenden Verfahren durchlaufen. Eine Metaanalyse aus fünf randomisierten Studien zeigte die Gleichwertigkeit beider Verfahren bezüglich des Gesamtüberlebens (41). *Veronesi und Fisher* machten den entscheidenden Schritt hin zum lokal begrenzten Vorgehen; sie schlugen vor, unter bestimmten Voraussetzungen die Brust zu erhalten und eine postoperative obligate Bestrahlung anzuschließen (42, 43). Hiernach ist der Anteil brusterhaltend operabler Mammakarzinome in Deutschland auf circa 75 Prozent gestiegen. Es gelten bestimmte Indikationen für die Entscheidung zu einer brusterhaltenden Therapie. Hierzu gehört das Vorliegen entweder von lokal begrenzten nicht-invasiven Karzinomen (DCIS oder LCIS) oder von invasiven Karzinomen mit günstigem Verhältnis von der Tumorgroße zum Brustvolumen (8, 44). Laut der *Interdisziplinären S3-Leitlinie* sollte der minimale Sicherheitsabstand zwischen invasivem Karzinom und Schnitttrand mindestens 1 mm (*no ink on tumor*) betragen, um eine prognostisch günstige Tumoresektion in sano (gleichbedeutend mit R0-Status) zu gewährleisten (45, 46). Die Amputation der Brust (Mastektomie) kann für die betroffene Frau von verstümmelndem Charakter sein. Operative Verfahren zur Brustrekonstruktion sollen bei Wunsch der Patientin dazu dienen, ihre körperliche Integrität zu erhalten. Hierzu können Prothesen oder aber auch Eigengewebe in Form von myokutanen Lappenplastiken eingesetzt werden. Sowohl nach Mastektomie als auch nach brusterhaltender Therapie ist einer Lymphonodektomie anzuraten, welche obligat dem diagnostischen und therapeutischen Konzept angehört. Auch hierbei ist in den letzten Jahren ein Wandel vernehmbar. So wurden früher üblicherweise systematisch die axillären und claviculären Lymphknotenstationen ausgeräumt, was nicht selten durch Auftreten von Lymphödemen und Sensibilitäts- oder Mobilitätsstörungen zu einer erhöhten Morbidität beigetragen hat. Heutzutage wird versucht, durch Markierung mit radioaktiven Substanzen (gegebenenfalls durch Farbstoffe ergänzt) die ersten ableitenden Lymphknoten der Brust (die sogenannten Sentinel oder auch Wächter-

lymphknoten) zu detektieren und anschließend operativ zu entfernen. Nur bei Befall des Sentinels würde man die axilläre Lymphonodektomie erweitern (44).

Der Resektion des Tumors schließt sich die adjuvante Therapie an. Sie hat zum Ziel, mögliche Absiedlungen zu eliminieren und die Patientin vor einem Rezidiv zu bewahren. Zu Letzterem dient die postoperative Bestrahlung, die vor allem gegen die lokale Filialisierung wirkt. Zur Bekämpfung von Fernmetastasen wird eine systemischen Therapie mit Zytostatika, Hormonen oder monoklonalen Antikörpern eingesetzt (47). Nach brusterhaltender Operation eines invasiven Karzinoms ist eine perkutane Bestrahlung obligat, wobei in das Zielvolumen die gesamte verbliebende Brust sowie die angrenzende Thoraxwand inbegriffen sein sollen. Nach Mastektomie senkt eine postoperative Radiotherapie der Brustwand das Risiko eines lokoregionalen Rezidivs und wird daher ab einer Tumorausbreitung entsprechend eines T3-Stadiums empfohlen (45, 48, 49). Bei Patienten mit östrogen- und/oder progesteron-rezeptorpositiven Tumoren ist zudem eine endokrine Behandlung indiziert. Durch Östrogenentzug kann das Wachstum von Mammakarzinomzellen eingedämmt werden. Hauptsubstanz hierfür ist Tamoxifen, welches zu den selektiven Östrogen-rezeptor-Modulatoren (SERM) gezählt wird. Des Weiteren finden Aromatasehemmer wie etwa Anastrozol häufig in Kombination mit einem SERM bei postmenopausalen Patientinnen ihren Einsatz. Diese greifen in die Östrogensynthese ein, indem sie die zelluläre Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen inhibieren. Gonadotropin-Analoga (GnRH-Agonisten) wie Goserelin können ebenfalls innerhalb der endokrinen Therapie verabreicht werden. Durch eine dauerhafte Überstimulation und damit einhergehende Desensibilisierung der Hypophyse führen sie zu einer verminderten Ausschüttung von LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon), wodurch es zu einer abgeschwächten Synthese von Testosteron und Östrogen kommt. Alle Patientinnen mit rezeptornegativen Tumoren sollten eine adjuvante zytostatische Therapie erhalten. Hierfür existieren verschiedene Schemata, aus denen je nach individueller Risikoabschätzung gewählt werden kann. Jahrelanger Standard war bisher das CMF-Protokoll mit den Zytostatika Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil (5-FU) gewesen, doch scheinen Kombinationen mit Anthrazyklinen wie das FAC- (5-FU + Adriamycin + Cyclophosphamid) oder das FEC-Schema (5-FU + Epirubicin + Cyclophosphamid) überlegen zu sein und sind daher bei fehlenden Kontraindikationen zu bevorzugen. Diese Anthrazyklin-basierte Therapie wird inzwischen mit einer zusätzlichen Gabe von Taxanen wie etwa Paclitaxel

kombiniert. Durch Untersuchung des Her2/neu-Status mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann seit einigen Jahren ein neuer Angriffspunkt im Rahmen der Brustkrebsbehandlung detektiert werden. Bei positivem Her2/neu-Status wird der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab über ein Jahr lang eingesetzt. Durch seine blockierende Wirkung auf den extrazellulären Teil des Her2-Rezeptors, wird dessen intrazelluläre wachstumsfördernde Wirkung unterbunden (45, 47, 50, 51).

Hat ein Mammakarzinom bereits Fernmetastasen ausgebildet, ist es oftmals nur mehr palliativ behandelbar. In den Vordergrund rücken hierbei Symptomreduktion und Erhalt der Lebensqualität. Wenn möglich sollte eine systemische Therapie erfolgen, wobei hier einer endokrinen Therapie wegen der geringeren Toxizität Vorrang gegeben werden sollte. Weitere Therapiemaßnahmen ergeben sich aus der individuellen Situation der Patientin. Bei ossären Metastasen ist unter Umständen eine Therapie mit Bisphosphonaten indiziert. Maligne Ergüsse müssen gegebenenfalls punktiert werden. Bei solitären Metastasen kann teilweise auch ein palliativer operativer Eingriff oder eine Radiatio sinnvoll sein (52).

Die Nachsorge zum Mammakarzinom beginnt mit der abgeschlossenen lokoregionären Primärbehandlung. Sie besteht aus Anamnese, körperlicher Untersuchung, ärztlicher Beratung, Betreuung und Begleitung sowie bildgebender Diagnostik. Rezidive werden auch nach bis zu 20 Jahren noch beobachtet. Je früher sie erkannt werden, desto größer ist der Behandlungserfolg mit kurativer Absicht. In den ersten drei Jahren nach der Operation empfiehlt sich daher eine vierteljährliche Kontrolle. Einmal im Jahr sollte eine Mammographie und halbjährlich eine Sonographie der Brust durchgeführt werden. Zudem sollte vierteljährlich eine gründliche Palpation der Brust durch einen Facharzt erfolgen. Eine intensivierte Diagnostik zum Metastasen-ausschluss mit Röntgen-Thorax, CT/MRT/PET, Szintigraphie oder Bestimmung der Tumormarker zählt nicht zur Standardnachsorge, sondern ist nur bei klinischen Auffälligkeiten indiziert (45, 47, 52, 53).

2.2 Ansatz dieser Forschungsarbeit – Die Glykosylierung und ihre Glykosyltransferasen

Ein aktueller Trend in der Zellbiologie ist die Untersuchung von Mechanismen zur Regulation von Zellfunktionen durch spezifische strukturelle und funktionelle Moleküle, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, ihre dazugehörigen Rezeptoren, Membrantransporter und Teile des Zytoskeletts. Zwei chemische Prozesse beeinflussen die Schlüsselmoleküle dieser Regulationsprozesse entscheidend: Die Phosphorylierung und die Glykosylierung. Hierbei wird der Phosphorylierung größtenteils Einfluss auf zellinterne Mechanismen, wie unter anderem Zellatmung und Zellzyklus, zugerechnet. Die interzelluläre Kommunikation und Aktion wird hingegen in erster Linie durch die Glykosylierung beeinflusst (54, 55), der in dieser Arbeit besondere Beachtung geschenkt werden soll.

In der Tat sind über 50 Prozent der in der Natur vorkommenden Proteine glykosyliert (56). Als sogenannte Glykoproteine liegt ihre Funktion in der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktion, weiterhin in der Organisation der Zellmembran und als Zielstruktur für Immunzellen und Bakterien. Die Struktur der Glykane wird beeinflusst von dem jeweiligen Zelltyp, sowie dem Entwicklungs- und Differenzierungsstadium der betroffenen Zelle und wird bei vielen pathologischen Veränderungen modifiziert (57). Da bisher noch keine Methoden zur Sequenzierung oder Synthese von Glykanen entwickelt werden konnten, erweisen sich Studien zur Struktur dieser Polysaccharide als äußerst schwierig (58). Es sind zwei Grundtypen der Glykosylierung bekannt: Die sogenannte N- und die O-Glykosylierung. Die Oligosaccharide eines O-gekoppelten Glykans sind entweder über N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an die Hydroxylgruppe eines Serins oder Threonins gebunden (**Abb. 8 a unten**) oder im Falle von Kollagen über Galactose an die Hydroxylgruppe eines Hydroxylysins (**Abb. 8 a oben**). O-gekoppelte Glykane bestehen im Allgemeinen eher aus kurzen Ketten mit häufig nur ein bis vier Zuckerresten. Bei allen N-gekoppelten Glykanen werden die Oligosaccharide über ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) mit dem Stickstoff der Amidgruppe eines Asparagins verbunden (**Abb. 8 b**). Typische N-gekoppelte Oligosaccharide beinhalten immer Mannose sowie N-Acetylglucosamin und haben normalerweise mehrere Verzweigungen, wovon jede mit einer negativ geladenen N-Acetylneuraminsäure (NANA) endet. Die verschiedenen Strukturen von N- und O-gekoppelten Oligosacchariden spiegeln Unterschiede in ihrer Biosynthese wider.

Die N-Glykosylierung findet im Endoplasmatischen Retikulum statt, wohingegen die O-Glykosylierung im Golgi-Apparat abläuft. Bei Letzterer werden die Zucker jeweils einzeln der Molekülkette angefügt, wobei jede Zuckerübertragung von einem eigenen Enzym katalysiert wird. Im Gegensatz dazu beginnt die Biosynthese der N-gekoppelten Glykane mit dem Anhängen eines bereits vorher aus 14 Zuckerresten gebildeten Oligosaccharids. Anschließend werden in einer festgelegten Abfolge sowohl weitere Zucker angehängt, als auch bestimmte Zucker wieder entfernt. Auch hier ist für jeden einzelnen Schritt ein eigenes Enzym zuständig (59).

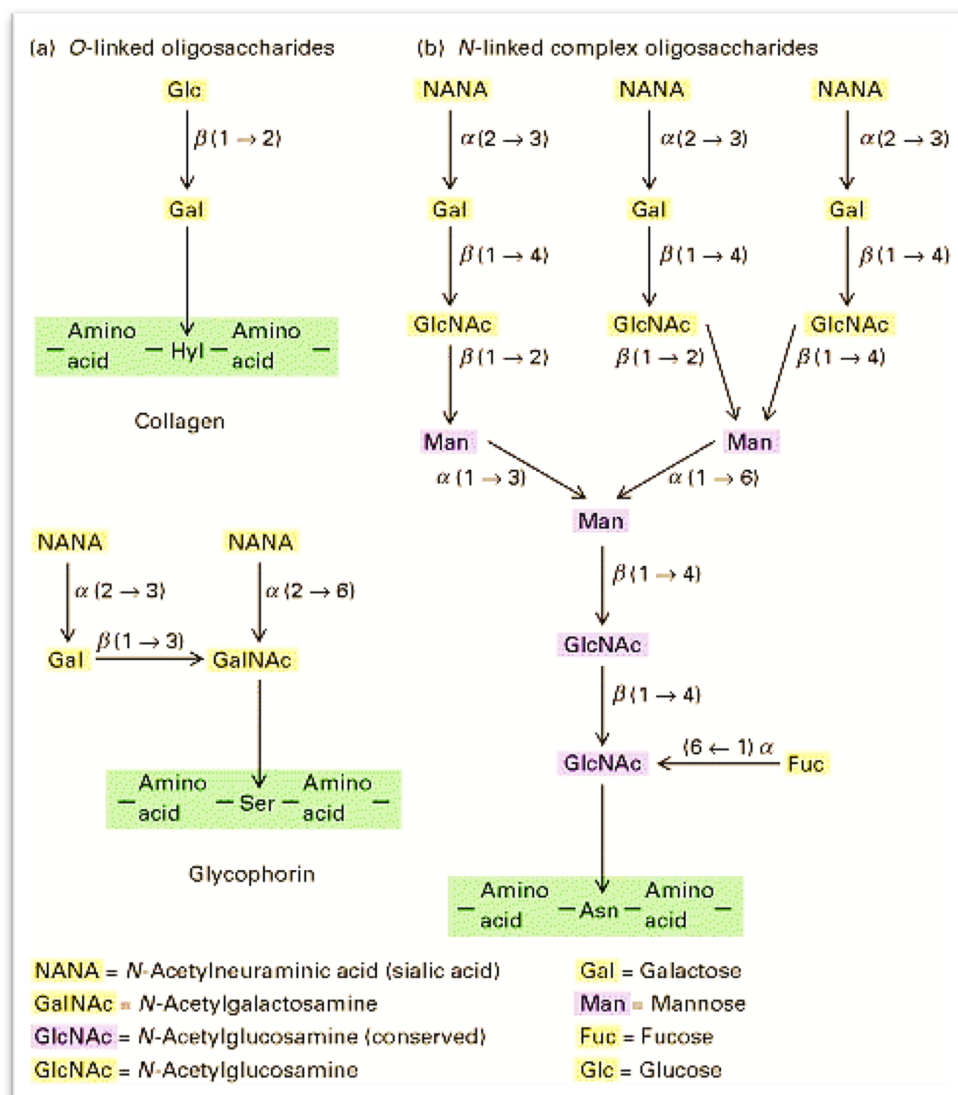
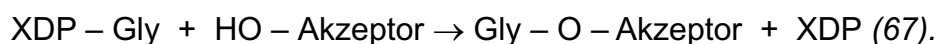


Abb. 8: Strukturen von typischen O- (a) und N- (b) Glykanen (59)

In der Tumorentwicklung ist häufig eine Modulation der Glykosylierung anzutreffen, wobei vor allem solche Proteine betroffen sind, die an dem Aufbau der Zelloberfläche beteiligt sind (55, 57, 60). Es sind bereits einige dieser sogenannten Tumor-assoziierten Kohlehydrat-Antigene (TACAs für „tumour associated carbohydrate antigens“) bekannt und ausgiebig untersucht. Beim Mammakarzinom gelten unter anderem das sialyl-Lewis- (sLe^X) und das sialyl-Thomsen-noevell-Antigen (sTn) als TACAs. Eine Modifikation der Glykosylierung wird mit einer schlechteren Prognose und kürzerem Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (61). Verkürzung der O-Glykane und gesteigerte Sialylation zählen hierbei zu den am häufigsten beobachteten Veränderungen der Glykosylierung (62, 63). Weiterhin beeinflussen Glykosylierungsmodifikationen die Morphologie von Tumorzellen, was die Formation von Metastasen zufolge haben kann (64).

Verantwortlich für Ausmaß und Art der Glykosylierung von Zelloberflächenmolekülen ist vornehmlich die unterschiedliche Expression von Glykosyltransferasen (65, 66). Diese Enzyme sind in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats zu finden, wo sie Kohlenhydratketten auf die jeweiligen Akzeptormoleküle übertragen. Bisher sind mehr als einhundert dieser Enzyme bekannt, die sich abhängig von den zu übertragenden Zuckermolekülen in mehrere Untergruppen einteilen lassen. Obwohl die cDNA der Glykosylierungsenzyme überraschenderweise deutliche Unterschiede in ihrer Exon-Intron-Sequenz aufweisen, zeigen die Transferasen selbst doch überwiegend eine ähnliche Grundstruktur. So besitzen Glykosylierungsenzyme eine hydrophobe Region, welche als Signal-Anker dient und eine Brücke zwischen einem kurzen, N-terminalen, ins Zytoplasma gerichteten Ende und einer längeren C-terminalen, katalytisch aktiven Domäne bildet. Letztere ist im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums oder Golgi-Apparats gelegen. Die chemischen Reaktionen, die durch Glykosylierungsenzyme katalysiert werden, beziehen zwei Substrate sowie mehrere Kofaktoren ein und können verallgemeinert wie folgt dargestellt werden:



Donoren der Zuckermoleküle sind hierbei üblicherweise aktivierte Formen von Nukleosiddiphosphat-Zuckern wie beispielsweise UDP-Galaktose oder GDP-Mannose, jedoch können auch Nukleosidmonophosphat-Zucker oder Lipidphosphate als Donoren dienen. Akzeptoren der Zuckermoleküle sind überwiegend Kohlenhydrate, seltener auch Lipide, Proteine, Nukleinsäuren oder andere kleinere Moleküle.

Die Zuckerreste werden in den meisten Fällen an das Sauerstoffmolekül der Hydroxylgruppe des Akzeptors angehängt (68).

Einer Veränderung der Glykosylierung von Zelloberflächenmolekülen, wie sie unter anderem während der Zelldifferenzierung und im Rahmen onkogenetischer Transformationen zu finden ist, liegt eine Alternation in der Expression von Glykosyltransferasen zugrunde. Funktionelle Folgen finden sich hierbei vor allem, wenn terminale Sequenzen der Glykosylierung betroffen sind. Die Expression der Glykosyltransferasen wird dafür höchstwahrscheinlich auf Ebene der Transkription reguliert (69).

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Korrelation zwischen der Expression von bestimmten Glykosylierungsenzymen und anderen Tumorcharakteristika, wie beispielsweise Tumormorphologie, Grading, Staging, sowie Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status vorliegt. Zur Untersuchung wurden exemplarisch drei verschiedene Glykosyltransferasen ausgewählt: N-Acetylgalaktosaminyltransferase 6 (GALNT6), β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 2 (GCNT2) und St6(α -N-Acetylneuraminyl-2,3- β -galactosyl-1,3)-N-acetyl-galactosamin- α -2,6-sialyltransferase I (St6GalNAc I). Im Folgenden soll beleuchtet werden, warum speziell diese Enzyme gewählt wurden.

2.2.1 N-Acetylgalaktosaminyltransferase 6 (GALNT6)

Enzyme der GALNT-Familie sind an den ersten Schritten der O-Glykosylierung vom Mucintyp beteiligt, indem sie N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an einen Serin- oder Threoninrest des Zielmoleküls anhängen, wodurch das Tn-Epitop geformt wird. Diese Reaktion findet in der Membran des Golgi-Apparats statt (70). Mucin 1 (MUC1), ein Transmembranprotein, ist durch Interaktionen mit EGFR, Östrogenrezeptor und β -Catenin an der Karzinogenese des Brustkrebses beteiligt (71). MUC1 wird von den meisten epithelialen Zellen ausgebildet und wird in Brustgewebe physiologisch beispielsweise während der Schwangerschaft und Stillzeit hochreguliert (62). Veränderungen in der O-Glykosylierung scheinen Einfluss auf die Regulierung von Proteinstabilität und Verteilung von MUC1 zu haben (72). *Park et al.* konnten mit Hilfe semiquantitativer Realtime-PCR eine Hochregulierung des GALNT6-Gens sowohl in Gewebeproben von Mammakarzinomen als auch in Brustkrebszelllinien nachweisen. Zudem führten sie Untersuchungen durch, in denen sie durch Small hairpin RNA

(shRNA) die endogene Ausbildung von GALNT6 stilllegten. Die Reduktion der Glykosyltransferase wurde von einer Unterdrückung der Zellproliferation begleitet (70). Anhand immunhistochemischer Färbungen zeigten *Berois et al.* eine Ausbildung von GALNT6 in Präparaten von Mammakarzinomen, wohingegen das Enzym an Geweben von nicht an Brustkrebs erkrankten Frauen nicht nachweisbar war. Hierbei war eine signifikante Assoziation der GALNT6-Expression insbesondere mit einem T1-Tumorstadium zu beobachten (73).

2.2.2 β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 2 (GCNT2)

Die Funktion von GCNT2 liegt in der Verzweigung von poly-N-Lactosamin durch Ausbildung von β -1,6-Bindungen zwischen N-Acetylglucosaminyl-Resten und einem Galactosyl-Rest (74). Lineare poly-N-Acetyllactosamine tragen das i-Blutgruppenantigen, welches bei homozygoter Ausführung in der Blutgruppe 0 resultiert. Verzweigte Moleküle hingegen tragen I-Blutgruppenantigene, die zu den Blutgruppen A, B oder AB führen. Jene i-, beziehungsweise I-Antigene sind nicht nur auf roten Blutkörperchen sondern auf der Oberfläche von fast allen menschlichen Zellen zu finden (75, 76). Bereits in den 80er Jahren wurde GCNT2 eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung des Mammakarzinoms zugeschrieben, da man eine deutliche Erhöhung des I-Antigens im Serum von Brustkrebspatientinnen beobachten konnte (77, 78). *Zhang et al.* konnten zeigen, dass die Expression von GCNT2 insbesondere im Zusammenhang mit der intrinsischen Brustkrebsuntergruppe vom Basal-like-Typ und der Ausbildung von Metastasen steht. Weiterhin fiel auf, dass GCNT2 in der Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Gewebeeigenschaften beteiligt ist. So führte ein Herabsetzen der GCNT2-Expression zu erhöhten Level der epithelialen Marker E-Cadherin und β -Catenin, sowie zu erniedrigten Werten mesenchymaler Marker wie Fibronectin und Vimentin (79).

2.2.3 St6(α -N-Acetylneuraminyl-2,3- β -galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosamin- α -2,6-sialyltransferase I (St6GalNAc I)

Die Glykosyltransferase St6GalNAc I wird als Sialyl-Tn-Synthetase angesehen, da sie den Schlüsselschritt der Sialyl-Tn-Biosynthese, die Übertragung eines Sialylsäurerests auf GalNAc α -O-Serin oder -Threonin, katalysiert. Bei dem Sialyl-Tn-Antigen (STn) handelt es sich um ein Disaccharid, welches physiologischerweise in den

Lumina sekretorischen Gewebes vornehmlich des Gastrointestinaltrakts zu finden ist. In der Brust wird es normalerweise nicht ausgebildet (80). Es wird in verschiedenen Karzinomentitäten, dem Mammakarzinom eingeschlossen, überexprimiert und ist dann mit einer erhöhten Aggressivität und schlechteren Prognose assoziiert (81). Beim Mammakarzinom besteht eine Korrelation zwischen der St6GalNAc I-exprimierenden RNA und der Ausbildung von STn (82). *Julien et al.* konnten zeigen, dass die durch eine erhöhte Expression von St6GalNAc I hervorgerufenen Abweichungen in der Glykosylierung zu bedeutenden Veränderungen der Zelleigenschaften, wie Verlust der Adhäsion und gesteigertes Migrationsverhalten, führen. Diese veränderten Zelleigenschaften zusammen mit einer bevorzugt im Tumorgebiet peripher erhöhten Anfärbbarkeit von STn sprechen dafür, dass die O-Glykosylierung die Zell-dissemination weg vom Primärtumor erleichtern könnte (83).

2.3 Methodischer Ansatz dieser Forschungsarbeit – Die Immunhistochemie

Die Immunhistochemie entwickelte sich aus dem Wunsch heraus, Gewebeeigenschaften durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen eindeutig identifizieren zu können. Bereits Mitte der vierziger Jahre gelang der Nachweis von Mikroorganismen in Gewebeschnitten durch eine damals als „direkte Immunfluoreszenz“ bezeichnete Methode (84). Seit den sechziger Jahren befassen sich Forscher mit Nachweismethoden basierend auf Farbstoffentwicklung am Ort der Reaktion. Mitte der achtziger Jahre dann begann der Einzug der Immunhistologie in das histologische Diagnostiklabor. Auch für therapeutische Maßnahmen am Patienten gewinnt die Immunhistologie zunehmend an Bedeutung durch die Identifikation von Tumoren und der Entwicklung von Antikörper-Therapien (sogenannte „targeted therapy“) (85).

2.3.1 Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung

In der Immunhistochemie macht man sich die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur präzisen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene zunutze. Hierbei sind Epitope eine Sequenz von fünf bis zehn Aminosäuren, gegen welche die Antigenbindungsstellen des eingesetzten Antikörpers gerichtet sind. Das Prinzip der immunhistochemischen Technik besteht aus zwei Schritten. Zuerst wird ein sogenannter primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens bindet. In einem zweiten Schritt muss dieser gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu existieren direkte und indirekte Methoden. Bei der direkten Methode wird der primäre Antikörper mit einem Markermolekül (zum Beispiel ein fluoreszierender Farbstoff, ein Enzym oder kolloidales Gold) gekoppelt, das nach der Immunreaktion im Gewebe nachgewiesen werden kann. Bei der indirekten Methode wird die Antigen-Antikörper-Reaktion im Gewebe mithilfe zusätzlicher immunologischer oder chemischer Reaktionen sichtbar gemacht. Dafür werden meist gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper eingesetzt, welche wiederum ein Markermolekül tragen (23).

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine indirekte Methode verwendet, die sogenannte ABC-Methode (**Abb. 9**). ABC steht dabei für Avidin-Biotin-Complex. Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin, über diese es an den biotinylierten Sekundärantikörper binden kann. Somit fungiert es als

Brückenmolekül, da an weitere freie Bindungsstellen das ebenfalls mit Biotin gekoppelte Enzym Peroxidase gekoppelt werden kann. Durch Hinzugabe des Chromogens 3,3-Diaminobenzidin (DAB), einem Substrat der Peroxidase, entsteht ein brauner Farbniederschlag am Ort der Bindung des Primärantikörpers, welcher im Lichtmikroskop sichtbar ist.

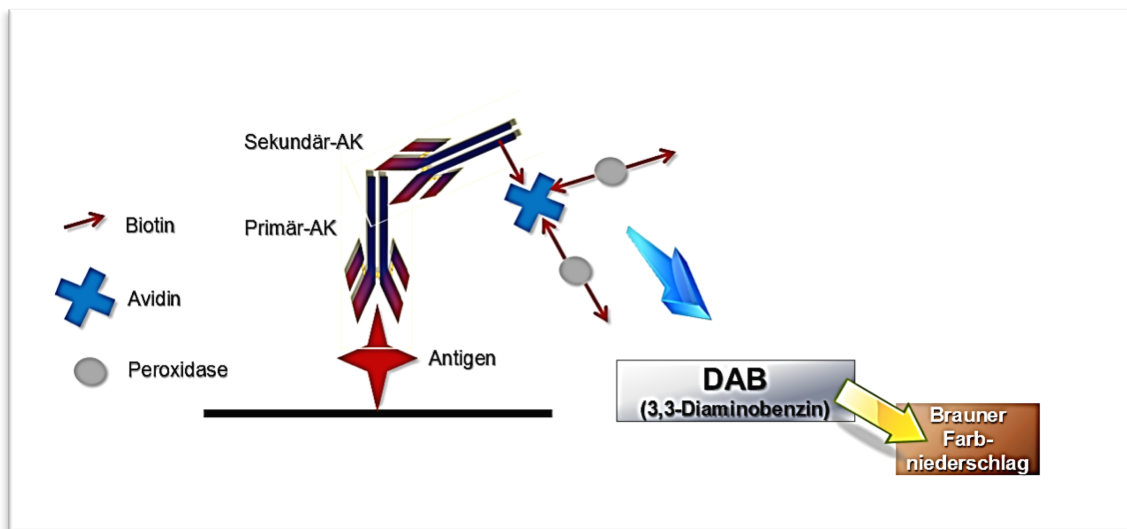


Abb. 9: ABC-Methode (nach (86))

2.3.2 Auswertung nach IRS

Die Bewertung der Expression aller drei Antigene, GCNT2, St6GalNAc I und GALNT6, wurde am Lichtmikroskop (Diaplan, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar) nach dem semiquantitativen Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner durchgeführt. Dieser IRS stellt das Produkt zwei beurteilter Faktoren dar.

Dabei wird zuerst die Intensität der Färbung mit 0 bis 3 bewertet, wobei

- „0“ für „keine Farbreaktion“,
- „1“ für „schwache Färbereaktion“,
- „2“ für „mäßige Färbereaktion“ und
- „3“ für „starke Färbereaktion“

definiert ist.

Zum Zweiten wird der Anteil der gefärbten Zellen beurteilt. Ein Wert von 0 bis 4 wird dabei bestimmt, wobei

- „0“ für „0 % der Zellen“,
- „1“ für „1-10 %“ der Zellen“,
- „2“ für „11-50 % der Zellen“,
- „3“ für „51-80 % der Zellen“ und
- „4“ für „81-100 % der Zellen“

steht (87).

2.4 Zielsetzung dieser Forschungsarbeit

Die hohe Inzidenz des Mammakarzinoms, wie auch seine ausgeprägte Vielfältigkeit erfordert die umfassende Untersuchung der Tumorcharakteristika, um den Patientinnen eine optimale, individuell angepasste Therapie zu gewährleisten und möglichst genaue Prognoseeinschätzungen machen zu können. Histopathologische Faktoren wie die Ausprägung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie der Her2/neu-Status sind Bestandteil der Therapieentscheidung. Allgemeines Ziel der Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten soll es sein, Malignome wie das Mammakarzinom noch detaillierter zu charakterisieren und neue Ansatzpunkte für Chemotherapeutika, antihormonelle Medikamente oder Antikörper zu finden.

Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ist es, die Verwendbarkeit von Glykosyltransferasen zur erweiterten Tumorcharakterisierung zu betrachten. Hierfür soll die Expression dieser Enzyme mit schon etablierten Tumormerkmalen korreliert werden. Zum Nachweis der Enzymausprägung wurde die Methode der Immunhistochemie gewählt, deren Durchführung schnell und kostengünstig in jedem größeren Forschungslabor einer medizinischen Einrichtung möglich sein sollte. Das Untersuchungsmaterial stellten intraoperativ gewonnene, später Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Mammakarzinomen unterschiedlichen Stagings und Gradings dar.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Eine Liste aller verwendeten Chemikalien, sowie Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien mitsamt den dazugehörigen Bezugsquellen ist im Anhang (Kapitel 7.2) zu finden.

3.1.1 Tumorpräparate für Untersuchungen an Primärtumorgewebe (Kollektiv 1)

Im immunhistologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian-Universität München ist eine Sammlung von in Paraffin gebetteten Mammakarzinomgewebeblöcken archiviert, welche im Zeitraum von 1991 bis 2001 an der genannten Klinik operiert und histologisch befundet wurden.

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine Auswahl von 235 Mammakarzinomschnitten zusammengestellt. Die Gewebeproben waren intraoperativ gewonnen worden, wobei das Operationsdatum der Patientinnen zwischen Juli 1998 und Mai 2000 gelegen hatte.

Die Zusammensetzung des Kollektivs erfolgte willkürlich, sodass Schnitte von Tumoren unterschiedlicher Histologie und verschiedenen Stagings und Gradings vorzufinden waren. Auch das Alter der operierten Patientinnen wies eine starke Varietät auf.

Die im Rahmen der Behandlung gesammelten Daten bezüglich des Alters bei Diagnosestellung, des Stagings und Gradings, sowie des Hormonrezeptorstatus und der Histologie der Tumoren wurden mittels Abfrage vom Tumorregister München um OAS (overall survival) und DFS (disease free survival) ergänzt. Im immunhistologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian-Universität München waren bereits Färbungen zur Bestimmung des Her4- beziehungsweise pHer4-Status des hier betrachteten Kollektivs durchgeführt wurden.

3.1.1.1 Altersverteilung

Das Alter der behandelten Patientinnen variierte zum Zeitpunkt der Operation von 22 Jahre bis 90 Jahre. Das Durchschnittsalter lag bei 58,0 Jahren, der Median bei 57 Jahren. 173 Patientinnen (73,6%) waren bei der Operation 50 oder älter, die restlichen 62 Patientinnen (26,4%) waren noch unter 50 Jahre alt.

3.1.1.2 Histologie

Es wurden Präparate von Mammakarzinomen verschiedenster Histologie untersucht. Am häufigsten war das duktales Mammakarzinom mit 110 Schnitten (46,8%) vertreten, gefolgt vom lobulären mit 48 Proben (20,4%). Des Weiteren lagen Proben von 22 medullären (9,4%), 8 tubulären (3,4%), 6 mucinösen (2,6%) und 5 papillären (2,1%) Mammakarzinomen vor. Es existierten ebenfalls die Mischformen ducto-lobulär mit 20 (8,5%) und tubulo-lobulär mit 10 (4,3%) Schnitten, sowie tubulo-medullär mit 1 Schnitt (0,4%). Von 5 Präparaten (2,1%) lag die histologische Klassifikation nicht vor.

Histologischer Subtyp	Anzahl n	Anteil (in %)
<i>duktal</i>	110	46,8
<i>lobulär</i>	48	20,4
<i>medullär</i>	22	9,4
<i>tubulär</i>	8	3,4
<i>mucinös</i>	6	2,6
<i>papillär</i>	5	2,1
<i>dukto-lobulär</i>	20	8,5
<i>tubulo-lobulär</i>	10	4,3
<i>tubulo-medullär</i>	1	0,4
<i>n.a.</i>	5	2,1
<i>Gesamt</i>	235	100,0

Tab. 4: Verteilung der histologischen Subtypen

3.1.1.3 Differenzierungsgrad

Von einem Teil der zu untersuchenden Gewebsschnitte (72 Stück, 30,6%) war bei der Diagnosestellung der Differenzierungsgrad nicht bestimmt worden. Unter den restlichen befanden sich 16 Tumoren (6,8%) im G1-Stadium, der größte Anteil mit 90 (38,3%) im G2- und 57 (24,3%) im G3-Stadium.

Differenzierungsgrad	Anzahl n	Anteil (in %)
G1	16	6,8
G2	90	38,3
G3	57	24,3
GX	72	30,6
Gesamt	235	100,0

Tab. 5: Verteilung der Differenzierungsgrade

3.1.1.4 Tumorausdehnung

Von den 235 Mammakarzinomen befanden sich 2 (0,9%) zum Zeitpunkt der Operation im Stadium des Carcinoma in situ. Den größten Anteil mit 157 (66,8%) stellten Tumoren im T1-Stadium dar, gefolgt von Mammakarzinomen im T2-Stadium mit 67 (28,5%). Es waren lediglich 1 Tumor (0,4%) im T3- und 5 (2,1%) im T4-Stadium vorhanden. Bei 3 Präparaten (1,3%) lagen keine Angaben zur Tumorausdehnung vor.

Tumor- ausdehnung	Anzahl n	Anteil (in %)
Cis	2	0,9
T1	157	66,8
T2	67	28,5
T3	1	0,4
T4	5	2,1
TX	3	1,3
Gesamt	235	100,0

Tab. 6: Verteilung der Tumorausdehnungen

3.1.1.5 Nodalstatus

Bei 127 der Patientinnen (54,0%) lag zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors keine Metastasierung in lokalen Lymphknoten vor. Ein N1-Stadium lag bei 89 Patientinnen (37,9%) vor, 9 (3,8%) befanden sich in einem N2-Stadium. Keine der Patientinnen, die in das zu untersuchende Panel eingeschlossen waren, wiesen ein N3-Stadium auf, wobei jedoch für 10 Patientinnen (4,3%) keine Aussagen über den Lymphknotenbefall gemacht werden konnten.

Nodalstatus	Anzahl n	Anteil (in %)
N0	127	54,0
N1	89	37,9
N2	9	3,8
N3	0	0,0
NX	10	4,3
Gesamt	235	100,0

Tab. 7: Verteilung des Nodalstatus

3.1.1.6 Metastasenstatus

186 Patientinnen (79,2%) waren zum Operationszeitpunkt metastasenfrei. Bei 9 Patientinnen (3,8%) hatte bereits eine Streuung in Fremdgewebe stattgefunden. Für 40 der Patientinnen (17,0%), deren Mammakarzinom-Gewebe untersucht wurde, konnte keine Aussage über eine Fernmetastasierung gemacht werden.

Metastasen- status	Anzahl n	Anteil (in %)
M0	186	79,2
M1	9	3,8
NX	40	17,0
Gesamt	235	100,0

Tab. 8: Verteilung des Metastasenstatus

3.1.1.7 Hormonrezeptorstatus

Von den 235 operierten Patientinnen wiesen 30 (12,8%) einen negativen Östrogenrezeptorstatus auf. Bei 2 Patientinnen (0,9%) besaßen 1-9% der Tumorzellen Östrogenrezeptoren. Der Großteil, mit 177 Patientinnen (75,3%), zeigte bei mehr als 9% der Mammakarzinomzellen einen positiven Östrogenrezeptorstatus. Über 26 Fälle (11,1%) konnte keine Aussage bezüglich des Status gemacht werden.

Anteil d. pos. Tumorzellen	Anzahl n	Anteil (in %)
0%	30	12,8
1-9%	2	0,9
10-100%	177	75,3
n.a.	26	11,1
Gesamt	235	100,0

Tab. 9: Verteilung des Östrogenrezeptorstatus

Für den Progesteronrezeptor zeigt sich eine ähnliche Verteilung. Hier waren 63 Patientinnen (26,8%) mit negativem Rezeptorstatus gefunden worden. Bei 4 Patientinnen (1,7%) war 1-9% der Krebszellen positiv, bei 127 (54,0%) waren mehr als 9% der Tumorzellen mit Progesteronrezeptoren versehen. Für 41 Patientinnen (17,5%) lagen keine Angaben zum Progesteronrezeptorstatus vor.

Anteil d. pos. Tumorzellen	Anzahl n	Anteil (in %)
0%	63	26,8
1-9%	4	1,7
10-100%	127	54,0
n.a.	41	17,5
Gesamt	235	100,0

Tab. 10: Verteilung des Progesteronrezeptorstatus

3.1.1.8 Her4- und pHer4-Status

An unserem Institut waren bereits immunhistochemische Färbungen von Her4 beziehungsweise pHer4 durchgeführt und ebenfalls nach dem IRS bewertet worden. Die Tabellen 11 und 12 zeigen die Verteilung auf die einzelnen Werte.

IRS (Her4)	Anzahl n	Anteil (in %)
0	72	30,6
1	6	2,6
2	34	14,5
3	23	9,8
4	52	22,1
5	0	0,0
6	25	10,6
7	0	0,0
8	7	3,0
9	8	3,1
10	0	0,0
11	0	0,0
12	3	1,3
n.a.	5	2,1
Gesamt	235	100,0

Tab. 11: Verteilung des Her4-Status

IRS (pHer4)	Anzahl n	Anteil (in %)
0	51	21,7
1	2	0,9
2	18	7,7
3	47	20,0
4	44	18,7
5	0	0,0
6	44	18,7
7	0	0,0
8	13	5,5
9	9	3,8
10	0	0,0
11	0	0,0
12	2	0,9
n.a.	5	2,1
Gesamt	235	100,0

Tab. 12: Verteilung des pHer4-Status

3.1.2 Tumorpräparate zum Vergleich von Primärtumor und dessen Absiedlungen (Kollektiv 2)

Zur weiteren Untersuchung der Expression der Glykosyltransferase GALNT6 wurde im Folgenden eine Zusammenstellung von Schnitten gewählt, die nach Metastasierungsart sortiert worden waren. Hierbei lagen 8 Proben (18,2%) von Mammakarzinomen vor, die zum Operationszeitpunkt noch keine Metastasierung, weder nodal noch in Fremdgewebe, ausgebildet hatten. Zudem enthielt das Panel 10 Mammakarzinome (22,7%), welche bereits in lokale Lymphknoten gestreut hatten, wobei ebenfalls die Gewebeproben der metastasierten Lymphknoten vorhanden waren. Wiederum 10 Schnitte (22,7%) existierten von Mammakarzinomen, aus denen in den Folgejahren der Operation ein Rezidiv hervorgegangen war. Auch diese Rezidive waren Teil des untersuchten Panels. Des Weiteren wurden 8 Mammakarzinome (18,2%) eingeschlossen, welche schon zum Zeitpunkt der Operation Fernmetastasen ausgebildet hatten und deren Gewebeproben ebenfalls untersucht wurden. Die letzte Subgruppe stellten 8 Schnitte (18,2%) dar, die als Carcinoma in situ eingestuft worden waren.

Tumorart & Metastasen-/Rezidivstatus	Anzahl n	Anteil (in %)
<i>Carcinoma in situ</i>	8	18,2
<i>MammaCa ohne Metastasen/Rezidiv</i>	8	18,2
<i>MammaCa mit LK-Metastase</i>	10	22,7
<i>MammaCa mit Rezidiv</i>	10	22,7
<i>MammaCa mit Fernmetastase</i>	8	18,2
<i>Gesamt</i>	44	100,0

Tab. 13: Zusammensetzung des Kollektivs 2

3.1.3 Antikörper

Um die Glykosylierungsenzyme GCNT2, St6GalNAc I und GALNT6 nachzuweisen, wurden kommerziell erhältliche Antikörper verwendet. Dabei waren alle drei Antikörper polyklonaler Natur und wurden als Immunglobuline des Isotyps G aus Kaninchen gewonnen.

Klone, Konzentration und Bezugsquellen sind in Tabelle 14 ersichtlich.

Antigen	Host	Klonalität/ Isotyp	Klon	Konzentration	Bezugsquelle
<i>GCNT2</i>	Rabbit	polyklonal IgG	R 12223	100 µg/ml	Novus Biologicals
<i>St6GalNAc I</i>	Rabbit	polyklonal IgG	R 05318	700 µg/ml	Novus Biologicals
<i>GALNT6</i>	Rabbit	polyklonal IgG	R 39974	790 µg/ml	GeneTex

Tab. 14: Informationen zu den verwendeten Antikörpern

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper werden Versuchstiere, in unserem Fall Kaninchen, mit dem durch verschiedene Verfahren gereinigtem Antigen unter Zusatz von Hilfsstoffen durch intrakutane oder intravenöse Injektionen immunisiert. Im Abstand von zwei Wochen wird den immunisierten Tieren Blut zur Testung auf Antikörper abgenommen und erneut das Antigen injiziert, das sogenannte Boostern. Ist ein entsprechend hoher Antikörpertiter erreicht, wird aus dem Blut der Versuchstiere chromatographisch die Immunglobulinfraction gewonnen und gegebenenfalls weiter aufgereinigt. Polyklonale Antiseren sind im Gegensatz zu monoklonalen immer ein Gemisch verschiedenster Antikörpermoleküle, die von unterschiedlichen antikörperproduzierenden Zellen gebildet wurden (88).

3.2 Methoden

3.2.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Um eine immunhistochemische Untersuchung auch noch einige Jahre nach der Entnahme der Proben möglich zu machen, muss das Gewebe konserviert werden. Dabei muss vor allem die Autolyse der Proteine verhindert werden, um eine möglichst naturgetreue Architektur der Gewebsstrukturen zu erhalten. Dies geschieht mit Hilfe von Methanal (Trivialname: Formaldehyd) in seiner gelösten Form Formalin, welches 40% Formaldehyd gelöst in Wasser enthält. Für die Zusammensetzung des verwendeten NBFs (für neutral buffered formalin) wird Formalin um 1:10 unter anderem mit anorganischen Salzen verdünnt. Diese Salze gewährleisten einen neutralen pH-Wert. Außerdem verändern sie den osmotischen Druck dahingehend, dass dieser dem in Säugerzellen gleicht. Die Fixation wird durch Bindung des Formalins an Seitenketten basischer Aminosäuren hervorgerufen. Methylenbrücken zwischen zwei Formaldehyd-bindenden Seiten sorgen für eine verringerte Permeabilität für Makromoleküle, wobei jedoch die Struktur der Proteine annähernd unverändert bleibt.

Trotz einer schnellen Penetration der Formaldehyd-Moleküle durch das Gewebe, laufen die nötigen chemischen Reaktionen nur langsam ab. Dies macht es notwendig, kleine Gewebestücke 24 Stunden fixieren zu lassen. Liegen größere Gewebestücke oder ganze Organe vor, werden diese zuerst *in toto* für 24 Stunden fixiert und anschließend, nach Entnahme der relevanten Gewebeproben, welche eine Dicke von 0,5 cm nicht überschreiten sollten, nochmals einer 24-stündigen Fixation unterzogen (89).

Bevor die nun fixierten Proben eingebettet werden können, müssen sie durch Herauswaschen mit Wasser von dem Fixationsmittel befreit werden. Beim Einbetten wird das Gewebe von einem flüssigen Stoff, hier Paraffin, durchtränkt, welcher sich anschließend in eine feste, homogene Masse umwandelt. Dabei lagert sich das Paraffin überall dort im Gewebe an, wo sich Wasser befindet. Dazu muss dieses zuvor mit Hilfe eines Automaten in einer Reihe aus 70%-igem und mehreren absoluten Ethanolen entfernt werden. Nun wird Xylol eingesetzt, das als Intermedium fungiert, das heißt es lässt sich sowohl mit Wasser als auch mit dem Ethanol mischen. Dadurch

wird noch das letzte rückständige Wasser aus dem Gewebe gewaschen, sodass anschließend die eigentliche Einbettung mit Paraffin erfolgen kann. Verwendet wird auf 60°C erhitztes und damit flüssiges Paraffin, welches um das Gewebe in Form eines Blockes gegossen wird. Aus dieser Form wird der Block nach Erkalten herausgelöst und bei minus 20°C gekühlt.

Um das Gewebe mit Hilfe der Mikroskopie beurteilen zu können, muss es in Schnitten vorliegen. Hierzu werden mit einem Schlittenmikrotom von dem angefertigten Block 2 bis 3 µm dicke Gewebsschnitte heruntergeschnitten und auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Für eine bessere Haftung sorgen positive Ladungen, die während des Beschichtungsvorganges auf den Objektträgern aufgebracht werden. Außerdem werden die Schnitte über Nacht bei circa 56 bis 58°C aufgetrocknet, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Haftung erbringen soll.

Die Schritte zur Konservierung, also Fixation, Einbettung und Schneiden, wurden von Mitarbeitern der Universitätsfrauenklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt. Die Durchführungsweise sollte hier jedoch trotzdem erläutert werden, um einen Überblick über die Entstehung des Materials zu geben. Alle folgenden methodischen Schritte wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nach Einarbeitung durch die Mitarbeiter des Labors für Immunhistologie von mir vorgenommen.

3.2.2 Die immunhistochemische Färbung

3.2.2.1 Vorbehandlung der Schnitte

Bevor die eigentliche Färbung mit dem Antikörper vollzogen werden kann, muss das Gewebe aus dem Paraffin gelöst werden. Dazu werden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol eingelegt. Ein anschließendes Schwenken in absolutem Ethanol soll das Xylol herauswaschen, bevor der nächste Schritt der Vorbehandlung, die Inaktivierung endogener Peroxidase, folgt. Wie später ersichtlich wird, beruht das Detektionssystem für den Primärantikörper auf einer Substratumsetzung durch eine hinzugeführte Peroxidase. Von daher ist die Hemmung der endogenen Peroxidase entscheidend, um eine unspezifische Anfärbung des zu untersuchenden Gewebes zu gewährleisten. Die Inaktivierung erfolgt durch eine 20-minütige Inkubation in mit Methanol verdünntem 3%-igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Fortgefahren wird mit einem erneuten Schwenken in absolutem Ethanol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (70%- und 50%-iges Ethanol) und abgeschlossen von einer Spülung in destilliertem Wasser. Durch die Formalinfixation der Gewebe (siehe 3.2.1) waren Proteinvernetzungen entstanden, die nun durch eine Hitzebehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer bei einem pH von 6 wieder gelöst werden müssen, um eventuell demaskierte Epitope freizulegen. Hierzu wird eine Gebrauchslösung, bestehend aus 18 ml verdünnter Citronensäure (21,01 g 0,1 M Citronensäure auf 1 l destilliertem Wasser), 82 ml verdünntem Na-Citrat (29,41 g 0,1 M Na-Citrat auf 1 l destilliertem Wasser), mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt, verwendet. Nachdem das Gemisch zum Kochen gebracht wurde, werden die Schnitte hineingestellt und für 5 Minuten im Dampfkochtopf belassen. Anschließend lässt man den Topf abkühlen. Zur Unterstützung führt man kaltes Leitungswasser hinzu. Spülen in destilliertem Wasser, gefolgt von 2-mal 2-minütigem Waschen in PBS schließen die Vorbehandlung der Schnitte ab.

3.2.2.2 Anfärben der zu untersuchenden Antigene

Nach durchgeführter Vorbehandlung der Schnitte kann die eigentliche immunhistochemische Färbung des Antigens erfolgen. Um elektrostatische Ladungen im Gewebe, welche zu einer ungewollten unspezifischen Bindung des Primärantikörpers führen könnten, zu sättigen, bedeckt man die Schnitte für 20 Minuten mit Goat-Normalserum (2 Tropfen Goat-Normalserum auf 10 ml sterilem PBS). Normalseren sind durch Mischen von Blutseren vieler gesunder Blutspender gewonnene Referenzpräparate, welche den durchschnittlichen Gehalt der normalen Komponenten beinhalten (90). Es folgt ein Abkippen des Blockierungsserums und die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper für 18 Stunden bei 4°C.

Die benötigte Konzentration der Antikörper wurde vor Anfärben der Schnitte im zu untersuchenden Panel an verschiedenen Geweben getestet. Hierbei wurden auch die geeigneten Gewebe für die Positivkontrollen (siehe 3.2.3) ermittelt. Für den Antikörper gegen GCNT2 wurde eine Verdünnung von 1:400 als günstig erachtet, für Anti-St6GalNAc I eine Verdünnung von 1:500 und für Anti-GALNT6 1:1000. Zur Verdünnung wurde jeweils steriles PBS verwendet.

Nachdem der primäre Antikörper in PBS 2-mal 2 Minuten abgewaschen wurde, lässt man den biotinylierten Sekundärantikörper, bestehend aus 2 Tropfen Goat-Normalserum, 1 Tropfen Anti-Rabbit-IgG und 10 ml sterilem PBS, für 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirken.

Nach erneutem 2-mal 2-minütigem Waschen in PBS werden die Schnitte mit dem ABC-Reagenz für 30 Minuten bedeckt, welches mindestens 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden muss, damit sich ein Komplex aus Avidin (Reagenz A, 4 Tropfen) und der biotinylierten Peroxidase (Reagenz B, 4 Tropfen) in 10 ml sterilem PBS ausbilden kann. Durch Hinzugabe des Chromogens 3,3-Diaminobenzidin (DAB) entsteht der braune Farbniederschlag am Ort der Bindung des Primärantikörpers. Der Peroxidase dient der Substratpuffer H_2O_2 als Katalysator. Ein Tropfen DAB wurde dafür zuvor in 10 ml des Substratpuffers verdünnt. Für die Farbreaktion belässt man das DAB 1 Minute auf den Schnitten. Unterbrochen wird die Reaktion durch einen Waschvorgang in Aqua dest.

3.2.2.3 Fertigstellung der Schnitte

Nachdem die Färbung der zu untersuchenden Antigene vollzogen wurde, folgt die abschließende Fertigstellung der Schnitte, begonnen mit der Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer.

Hämatoxylin, Hauptbestandteil des Hämalauns, oxidiert beziehungsweise reift durch den Luftsauerstoff bei einem Verlust von zwei Wasserstoffatomen zu Hämatein. Eine künstliche Reifung kann unmittelbar durch Zusatz von Oxidanzien erreicht werden. Hämatein ist ein schwach negativer Farbstoff und in Lösung gelbbraun gefärbt. Erst durch Zusatz von Alaunsalzen entstehen Hämatoxylinlacke, die stark positiv geladen sind und damit Basophilie einer Struktur anzeigen können. Wenn es sich um Aluminium-Alaun handelt, wird der Metallion-Farbstoffkomplex als Hämalaun bezeichnet (91). Eine selektive Kernfärbung wird durch saures Milieu begünstigt, andere Zellkomponenten werden jedoch meist auch mit einer zart graublauen Anfärbung versehen. Mit Mayers Hämalaun erzielt man in circa 5 Minuten eine ausreichende Kernfärbung, jedoch ist diese Dauer nur ein Richtwert, variiert in Abhängigkeit vom Alter des verwendeten Hämalauns. Die Farbe des Hämalauns schlägt ab einem pH von 3 in blau um. Dazu werden die Schnitte für 2 Minuten in Leitungswasser gespült (92).

Nach erfolgter Gegenfärbung müssen die Schnitte entwässert werden, da das Eindeckmedium Eukitt hydrophob ist. Dies geschieht durch Schwänken in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%-, 96%igem und absolutem Ethanol, abschließend durch Überführung in Xylol. Nach der Entwässerung werden die Präparate luftdicht in dem gut klebenden Einschlussmittel Eukitt, welches den gleichen Brechungsindex wie Glas hat, eingeschlossen. Damit ist eine Asservierung der Schnitte über viele Jahre möglich.

3.2.3 Kontrollen

Bei jedem Färbedurchlauf wurde eine Positivkontrolle mit gefärbt, um von der Verlässlichkeit der Färbeergebnisse ausgehen zu können. Dabei wurden exakt die gleichen Schritte zur Färbung durchgeführt wie bei den anderen Schnitten. Es wurden hierfür Gewebe gewählt, von denen bekannt war, dass sie das jeweilige Antigen enthielten. Bei mehreren Testdurchläufen, bei denen zudem auch die nötige Antikörperkonzentration ermittelt werden sollte, wurden verschiedene Gewebe ausprobiert, von denen dann jeweils eines für die eigentlichen Färbedurchgänge ausgewählt wurde. Für das Enzym GCNT2 wurden Gewebeproben von Colon, Niere und Ovar getestet, wobei das Colon als Positivkontrolle gewählt wurde (**Abb. 10**). Aus den Geweben Colon, Uterus und Plazenta wurde der Uterus als Positivkontrolle für das Protein St6GalNAc I ausgesucht (**Abb. 11**). Für GALNT6 galt Plazentagewebe als Positivkontrolle (**Abb. 12**), weitere getestete Gewebe waren Colon und Schilddrüse.

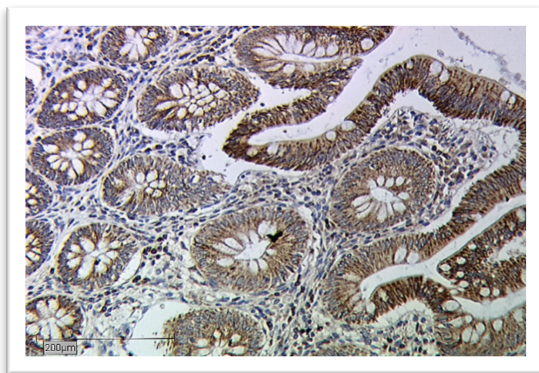


Abb. 10: Positivkontrolle GCNT2 (Colon)

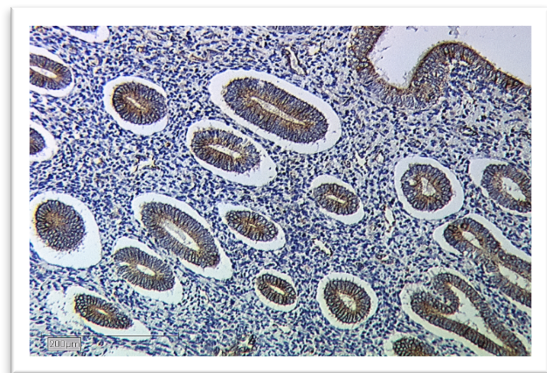


Abb. 11: Positivkontrolle St6GalNAc I (Uterus)

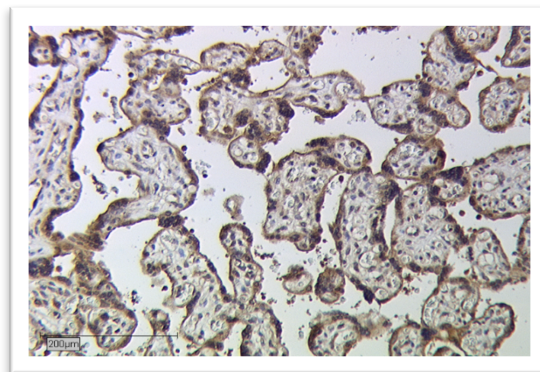


Abb. 12: Positivkontrolle GALNT6 (Plazenta)

Falsch positive Ergebnisse wären zu erwarten gewesen, wenn sich unspezifische Färbungen bei den Positivkontrollen gezeigt hätten, wie eine Färbung der Zellkerne, die bei zytoplasmatischen Proteinen, wie die hier untersuchten Glykosylierungsenzyme, nicht vorzuweisen sein sollte. Hätten sich die Positivkontrollen während eines Färbegangs nicht anfärben lassen, hätte von falsch negativen Ergebnissen ausgegangen werden müssen.

Neben den Positivkontrollen wurde für jedes Enzym einmalig eine Isotypenkontrolle durchgeführt (**Abb. 13-15**). Hierfür wurden die gleichen Gewebe verwendet, die auch schon als Positivkontrollen gedient hatten. Damit war gesichert, dass das Antigen vorhanden war. Für die Isotypenkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers ein Negativ-Kontrollserum aus der gleichen Tierspezies verwendet, die sich nicht gegen Antigene der Spezies Mensch richtete. Von daher sollte keinerlei Bindung des Detektionssystems an das Gewebe erfolgen, da schon zuvor keine Bindung eines Antikörpers an Antigene stattgefunden hatte. Wäre es trotzdem zu einer Anfärbung gekommen, hätte von unspezifischen Bindungen des Detektionsenzym ausgegangen werden müssen.

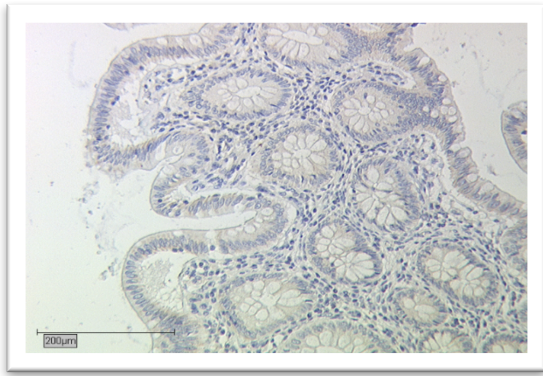


Abb. 13: Isotypenkontrolle GCNT2 (Colon)

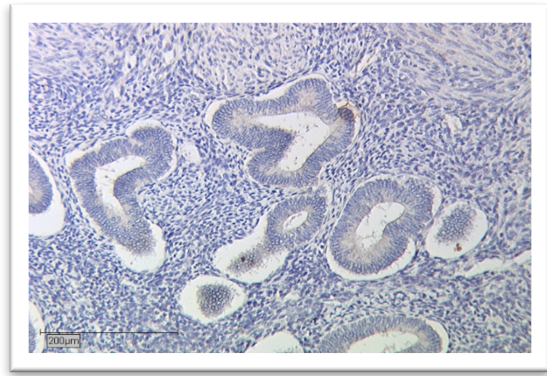


Abb. 14: Isotypenkontrolle St6GalNAc I (Uterus)

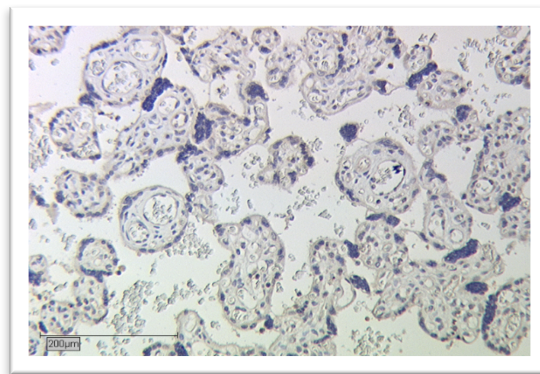


Abb. 15: Isotypenkontrolle GALNT6 (Plazenta)

3.2.4 Mikroskopie

Nach erfolgter Färbung und Einbettung wurden die Schnitte mit Hilfe der Mikroskopie bewertet, um den in Kapitel 2.3.2 beschriebenen IRS zu bestimmen. Dafür wurde ein Leitz Diaplan Lichtmikroskop mit vier unterschiedlichen Objektiven (6,3x, 10x, 25x und 40x) verwendet. Die Abbildungen 16 bis 24 zeigen für jede Glykosyltransferase exemplarische Aufnahmen zu den Färbeintensitäten 1 bis 3. Die Schnitte dafür stammen aus Kollektiv 1. Auf den Abbildungen 25 bis 30 sind ausgewählte Schnitte des Kollektivs 2 zu sehen. Sie zeigen die immunhistochemische Anfärbung des Primärtumors im Vergleich zu seinen Absiedlungen beziehungsweise seines Rezidivs. Dabei sind die hier abgebildeten Aufnahmen alle mit einem Objektiv von 10-facher Vergrößerung aufgenommen worden.

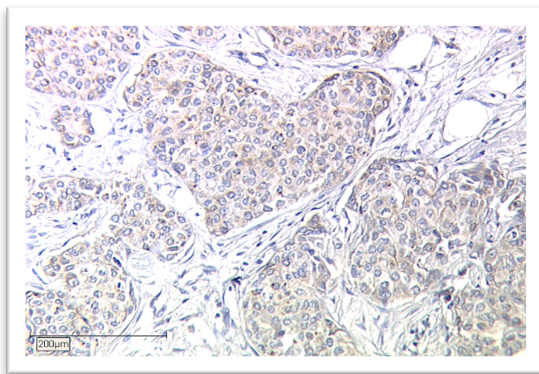


Abb. 16: GCNT2 – Färbeintensität 1

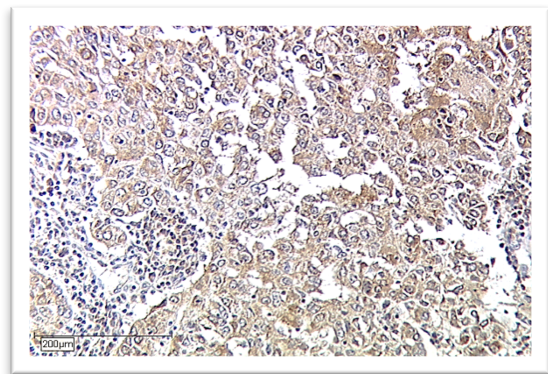


Abb. 17: GCNT2 – Färbeintensität 2

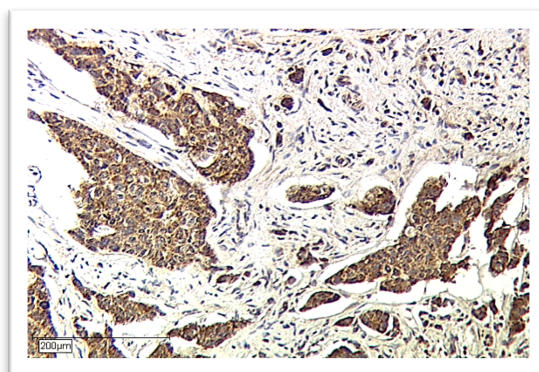


Abb. 18: GCNT2 – Färbeintensität 3

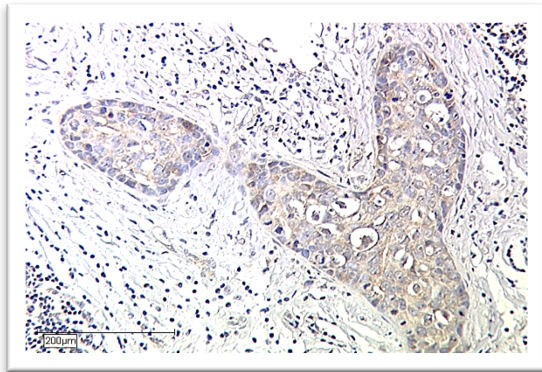


Abb. 19: St6GalNAc I – Färbeintensität 1

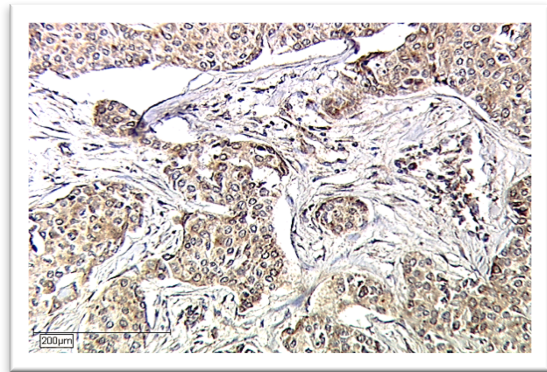


Abb. 20: St6GalNAc I – Färbeintensität 2

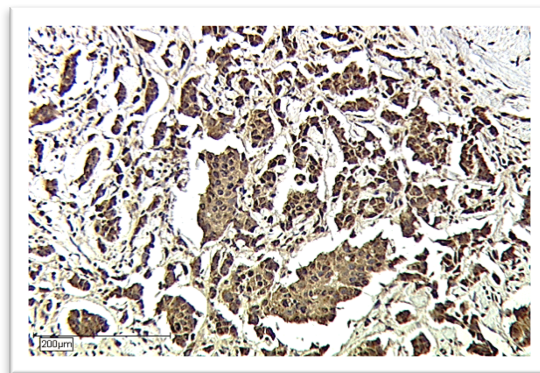


Abb. 21: St6GalNAc I – Färbeintensität 3

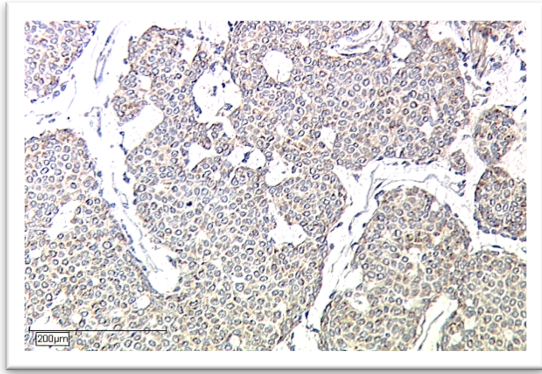


Abb. 22: GALNT6 – Färbeintensität 1

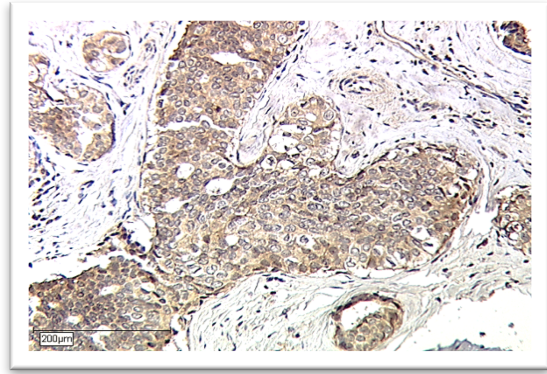


Abb. 23: GALNT6 – Färbeintensität 2

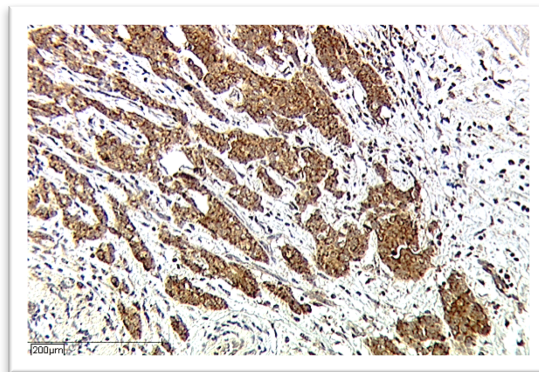


Abb. 24: GALNT6 – Färbeintensität 3

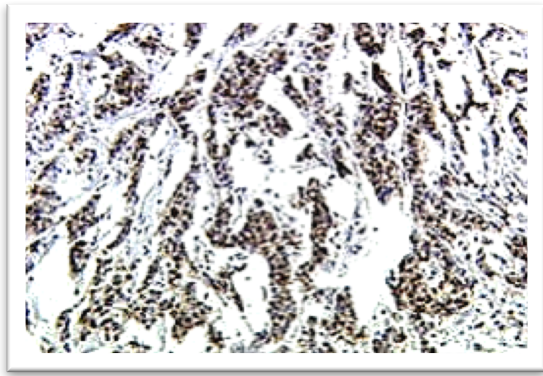


Abb. 25: GALNT6 - Tumor mit LK-Metastase

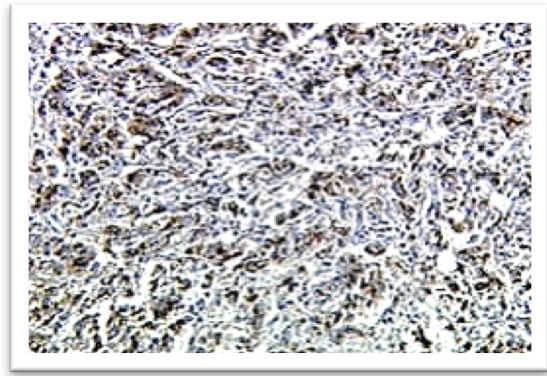


Abb. 26: GALNT6 – Gewebe der LK-Metastase

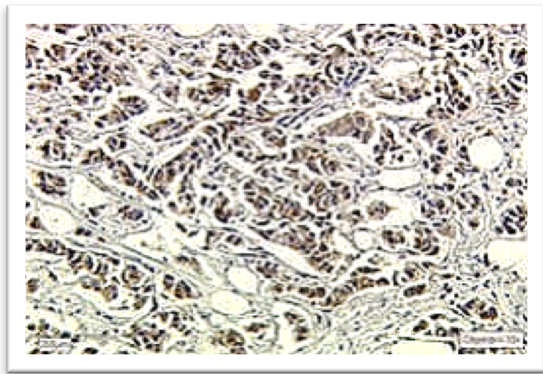


Abb. 27: GALNT6 – Tumor mit Fernmetastase

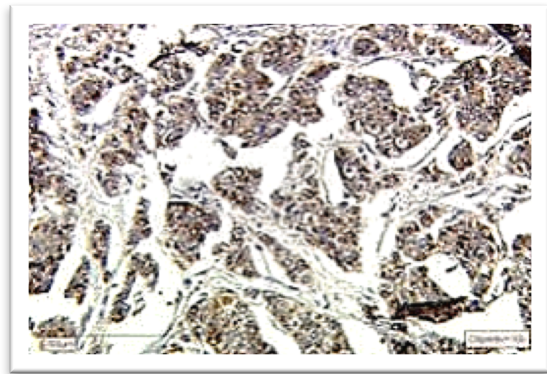


Abb. 28: GALNT6 – Gewebe der Fernmetastase

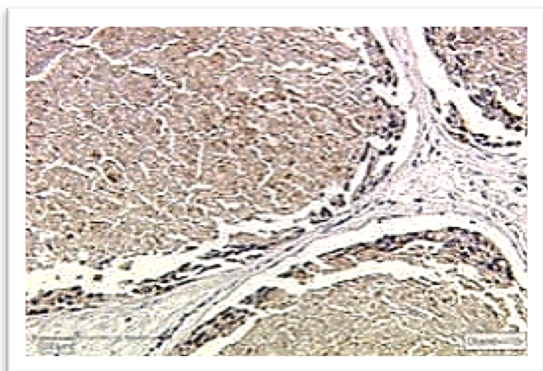


Abb. 29: GALNT6 – Tumor mit Rezidiv

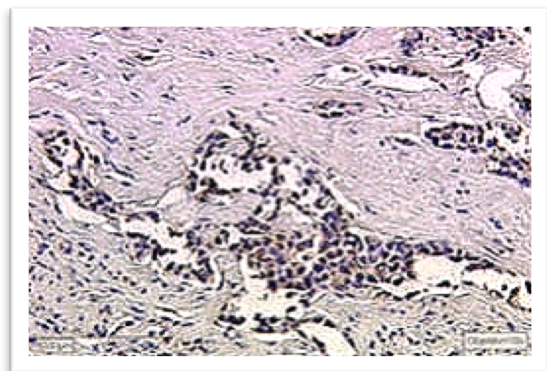


Abb. 30: GALNT6 – Gewebe des Rezidivs

3.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“, SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA), Version 20.0 für Windows verwendet.

Da es sich um ein nicht-normalverteiltes Patientenkollektiv handelt, kam im Falle von zwei Variablen der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Wurden mehr als zwei Variablen verglichen, wurde der Kruskal-Wallis-H-Test angewendet. Hierbei wurde $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

Für Korrelationen wurde der Spearman-Rho-Test verwendet. Auch hier galt ein $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an Primärtumorgewebe (Kollektiv 1)

4.1.1 Histologie

Zwischen dem histologischen Subtyp und der Expression der Glykosylierungsenzyme GCNT2, St6GalNAc I und GALNT6 zeigte sich keine eindeutige Korrelation. Es wurden die Mittelwerte des Immunreaktiven Scores von Schnitten des duktales, des lobulären und des medullären Subtyps verglichen. Wegen einer zu geringen Fallzahl wurden andere Subtypen aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Expression aller drei Glykosylierungsenzyme war beim duktales und lobulären Mammakarzinom sehr ähnlich. Der medulläre Subtyp wies im Durchschnitt stets einen geringeren IRS auf. Dieser Unterschied war jedoch für GCNT2 und St6GalNAc I nicht signifikant ($p = 0,875$ und $p = 0,911$). Für GALNT6 lag er im aussagekräftigen Bereich ($p = 0,080$).

Histologie	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>duktal</i>	107	6,58	1	12	60,8%	2,764
<i>lobulär</i>	48	6,62	0	12	27,3%	3,406
<i>medullär</i>	21	6,33	3	12	11,9%	2,989
<i>Gesamtsumme</i>	176	6,56	0	12	100,0%	2,962

Tab. 15: GCNT2, IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>duktal</i>	107	5,57	0	12	61,1%	3,545
<i>lobulär</i>	47	5,57	0	12	26,9%	3,676
<i>medullär</i>	21	5,24	0	12	12,0%	4,110
<i>Gesamtsumme</i>	175	5,53	0	12	100,0%	3,631

Tab. 16: St6GalNAc I, IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>duktal</i>	102	7,41	1	12	59,6%	2,562
<i>lobulär</i>	48	8,00	2	12	28,1%	2,821
<i>medullär</i>	21	6,48	4	8	12,3%	1,990
<i>Gesamtsumme</i>	171	7,46	1	12	100,0%	2,601

Tab. 17: GALNT6, IRS abhängig von der Histologie

4.1.2 Differenzierungsgrad

Wegen mangelnder Fallzahl wurden für die Analyse Tumoren, denen ein Grading von 1 oder 2 zugeordnet worden war, in einer Gruppe den Tumoren mit einem Grading von 3 gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich jeweils eine schwächere Expression der drei Glykosylierungsenzyme bei G3-Karzinomen. Dieser Unterschied war für GALNT6 am deutlichsten und erreichte statistische Signifikanz ($p = 0,029$), wobei er auch für GCNT2 und St6GalNAc I noch im aussagekräftigen Bereich lag ($p = 0,104$ und $p = 0,094$).

Grading	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
G1 oder G2	107	6,85	0	12	66,9%	2,858
G3	53	6,09	1	12	33,1%	2,490
Gesamtsumme	160	6,60	0	12	100,0%	2,757

Tab. 18: GCNT2, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad

Grading	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
G1 oder G2	105	6,10	0	12	66,0%	3,703
G3	54	5,04	0	12	34,0%	3,359
Gesamtsumme	159	5,74	0	12	100,0%	3,615

Tab. 19: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad

Grading	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
G1 oder G2	102	7,83	3	12	65,4%	2,514
G3	54	6,81	1	12	34,6%	2,481
Gesamtsumme	156	7,48	1	12	100,0%	2,541

Tab. 20: GALNT6, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad

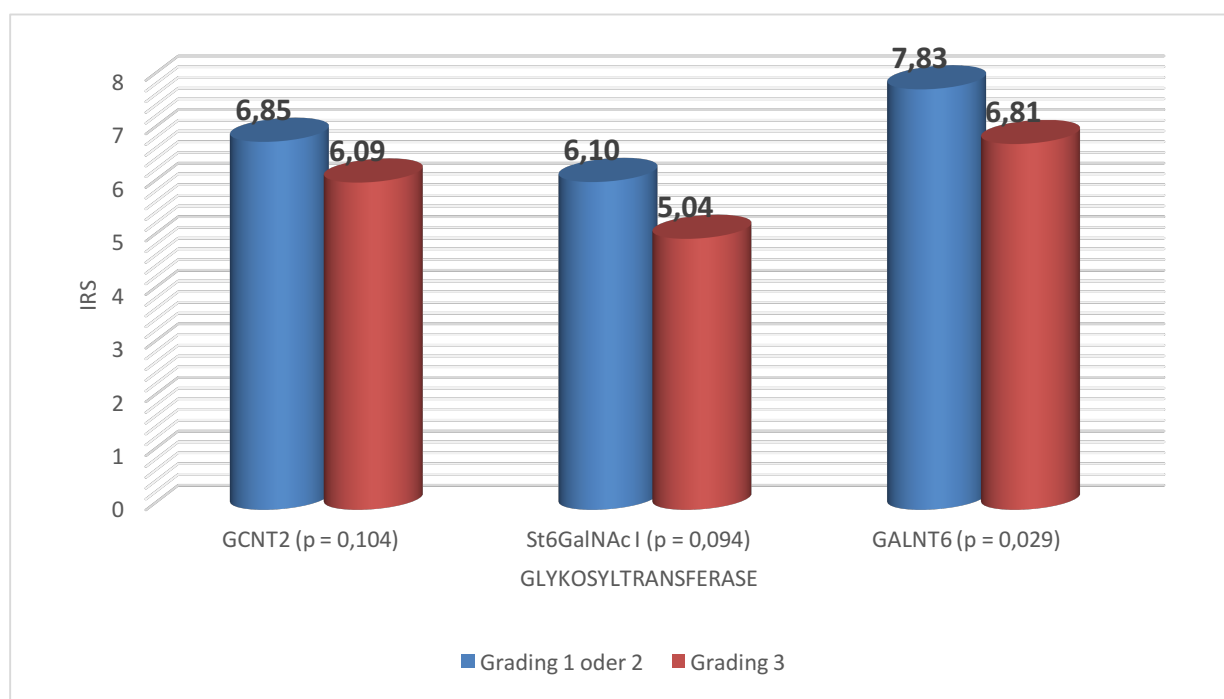


Abb. 31: Abhängigkeit der IRS vom Differenzierungsgrad

4.1.3 Tumorausdehnung

Zwecks der Analyse einer Abhängigkeit der Expression der Glykosyltransferasen von der Tumorausdehnung wurden ebenfalls aufgrund zu geringer Fallzahl einiger Stadien Subgruppen gebildet. Hierbei wurden das Carcinoma in situ und T1-Tumoren den Karzinomen im T2-, T3- und T4-Stadium gegenübergestellt. Ähnlich wie beim Grading war eine deutliche Tendenz dahingehend zu erkennen, dass Tumoren mit einer geringeren Ausdehnung oder Carcinoma in situ als Tumorstufen eine stärkere Ausprägung der Glykosylierungsenzyme aufwiesen, als Tumoren eines höheren Stadiums. Wiederum war dieser Unterschied am stärksten für das Enzym GALNT6 zu vermerken, was sich auch im Erreichen der statistischen Signifikanz widerspiegelte ($p = 0,012$). Für GCNT2 und St6GalNAc I wurde zwar kein signifikantes Niveau erreicht, jedoch lagen die Überschreitungswahrscheinlichkeiten im aussagekräftigen Bereich ($p = 0,066$ und $p = 0,059$).

T-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>Cis oder T1</i>	157	6,69	0	12	69,5%	2,954
<i>T2 – T4</i>	69	6,00	1	12	30,5%	2,844
<i>Gesamtsumme</i>	226	6,48	0	12	100,0%	2,932

Tab. 21: GCNT2, IRS abhängig von der Tumorausdehnung

T-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>Cis oder T1</i>	153	5,78	0	12	68,3%	3,648
<i>T2 – T4</i>	71	4,79	0	12	31,7%	3,410
<i>Gesamtsumme</i>	224	5,46	0	12	100,0%	3,596

Tab. 22: St6GalNAc I, IRS abhängig von der Tumorausdehnung

T-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>Cis oder T1</i>	150	7,77	1	12	67,9%	2,450
<i>T2 – T4</i>	71	6,87	2	12	32,1%	2,715
<i>Gesamtsumme</i>	221	7,48	1	12	100,0%	2,567

Tab. 23: GALNT6, IRS abhängig von der Tumorausdehnung

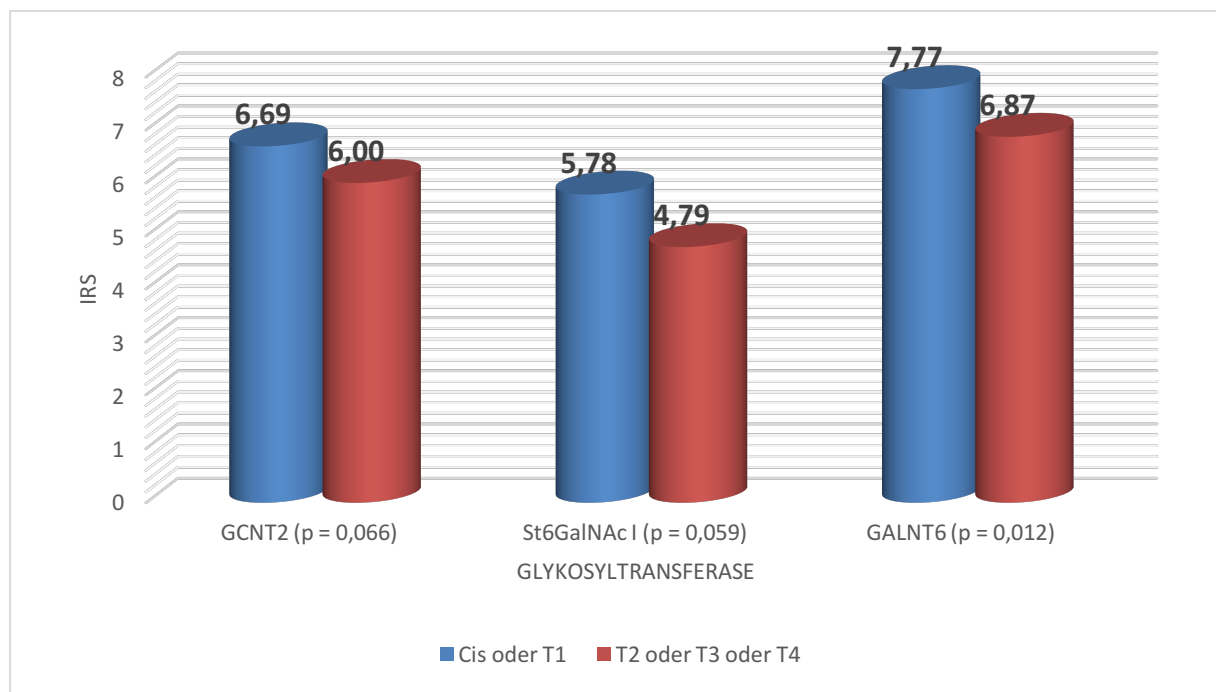


Abb. 32: Abhängigkeit der IRS von der Tumorausdehnung

4.1.4 Nodalstatus

Beim Vergleich der immunhistochemischen Anfärbung von Tumoren mit unterschiedlichem Nodalstatus war kein signifikantes Ergebnis zu verzeichnen. Für die Analyse sind alle Tumoren mit positivem Nodalstatus, unabhängig der Anzahl der infiltrierten Lymphknoten in einer Gruppe zusammengefasst und den N0-Mammakarzinomen gegenübergestellt worden. Die Werte zwischen positivem und negativem Nodalstatus wiesen nur minimale Unterschiede auf.

N-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
N0	124	6,27	0	12	56,6%	2,933
N1 – N4	95	6,62	0	12	43,4%	2,878
Gesamt-summe	219	6,42	0	12	100,0%	2,908

Tab. 24: GCNT2, IRS abhängig vom Nodalstatus

N-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
N0	124	5,42	0	12	57,1%	3,727
N1 – N4	93	5,46	0	12	42,9%	3,434
Gesamt-summe	217	5,44	0	12	100,0%	3,596

Tab. 25: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Nodalstatus

N-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
N0	120	7,52	1	12	56,1%	2,635
N1 – N4	94	7,32	2	12	43,9%	2,424
Gesamt-summe	214	7,43	1	12	100,0%	2,540

Tab. 26: GALNT6, IRS abhängig vom Nodalstatus

4.1.5 Metastasenstatus

Das Vorhandensein von Metastasen ging bei allen drei Glykosyltransferasen, besonders jedoch bei GCNT2 und St6GalNAc I, mit einem durchschnittlich deutlich höheren Immunreaktivem Score einher. Jedoch wurde bei keinem der Enzyme statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,383$ für GCNT2, $p = 0,497$ für St6GalNAc I und $p = 0,957$ für GALNT6). Als Ursache hierfür ist die zu geringe Fallzahl ($N = 9$) der für Metastasen positiven Mammakarzinom-Schnitte zu vermuten.

M-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>M0</i>	181	6,44	0	12	95,3%	2,811
<i>M1</i>	9	7,44	3	12	4,7%	3,283
<i>Gesamt-summe</i>	190	6,48	0	12	100,0%	2,834

Tab. 27: GCNT2, IRS abhängig vom Metastasenstatus

M-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>M0</i>	179	5,32	0	12	95,2%	3,573
<i>M1</i>	9	6,33	0	12	4,8%	4,062
<i>Gesamt-summe</i>	188	5,37	0	12	100,0%	3,593

Tab. 28: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Metastasenstatus

M-Staging	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>M0</i>	179	7,42	1	12	95,1%	2,476
<i>M1</i>	9	7,56	4	12	4,9%	4,216
<i>Gesamt-summe</i>	185	7,43	1	12	100,0%	2,570

Tab. 29: GALNT6, IRS abhängig vom Metastasenstatus

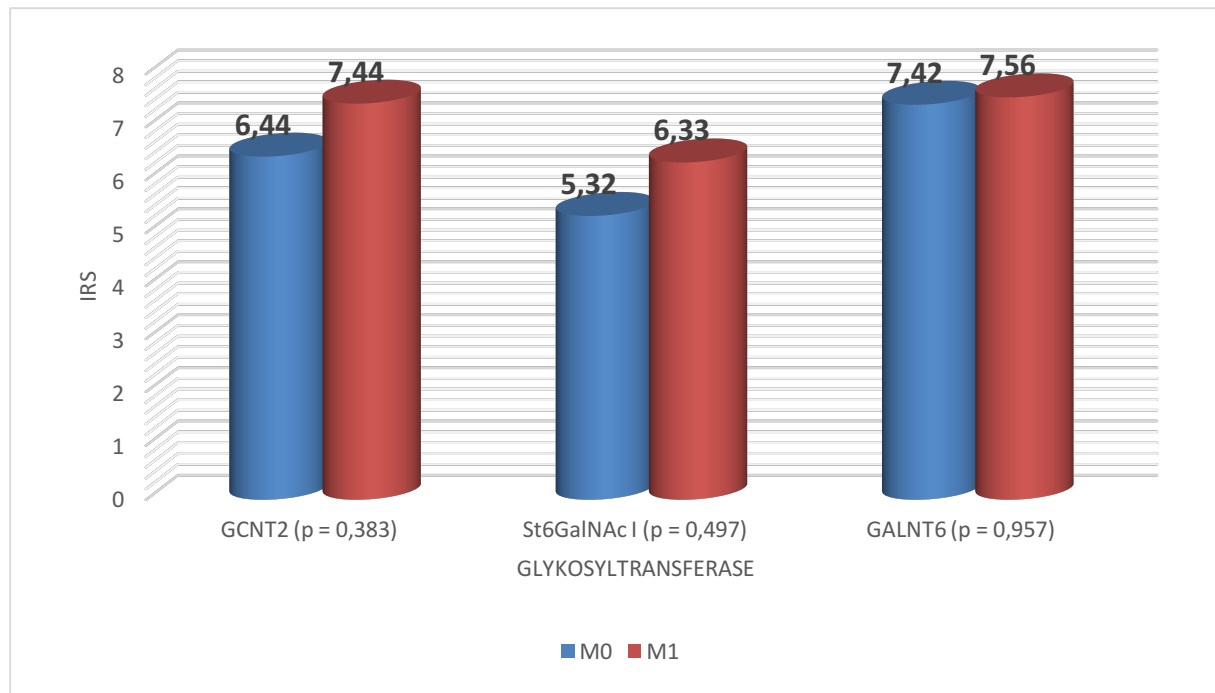


Abb. 33: Abhängigkeit der IRS vom Metastasenstatus

4.1.6 Hormonrezeptorstatus

Beim Vergleich der Expression der Glykosylierungsenzyme in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Östrogen (ER)- bzw. von Progesteronrezeptoren (PR) wurden zwei Gruppen gebildet. Die erste Gruppe schloss solche Tumoren ein, bei denen höchstens 9% der Zellen Rezeptoren für Östrogen beziehungsweise Progesteron besaßen. Diese Tumoren galten als ER- beziehungsweise PR-negativ. In der zweiten Gruppe befanden sich die Tumoren deren Zellen zu 10-100% einen positiven ER- beziehungsweise PR-Status hatten und damit als ER- beziehungsweise PR-positiv gewertet wurden.

4.1.6.1 Östrogenrezeptorstatus

Für den Östrogenrezeptor war eine deutliche Tendenz dahingehend zu beobachten, dass ER-positive Tumoren eine stärkere Expression aller drei Glykosylierungsenzyme vorwiesen. Besonders stark war dieser Unterschied für GCNT2 und GALNT6 zu beobachten. Bei beiden Enzymen wurde statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,023$).

und $p = 0,048$). Für St6GalNAc I lag der Unterschied mit einem p -Wert von 0,454 weit entfernt vom Erreichen einer statistischen Signifikanz.

ER-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>negativ</i> (0-9%)	32	5,50	0	12	15,7%	3,152
<i>positiv</i> (10-100%)	172	6,71	0	12	84,3%	2,822
<i>Gesamt-summe</i>	204	6,52	0	12	100,0%	2,901

Tab. 30: GCNT2, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus

ER-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>negativ</i> (0-9%)	32	5,09	0	12	15,9%	4,003
<i>positiv</i> (10-100%)	169	5,51	0	12	84,1%	3,531
<i>Gesamt-summe</i>	201	5,44	0	12	100,0%	3,602

Tab. 31: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus

ER-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>negativ</i> (0-9%)	30	6,67	1	12	15,1%	2,383
<i>positiv</i> (10-100%)	169	7,75	2	12	84,9%	2,618
<i>Gesamt-summe</i>	199	7,59	1	12	100,0%	2,607

Tab. 32: GALNT6, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus

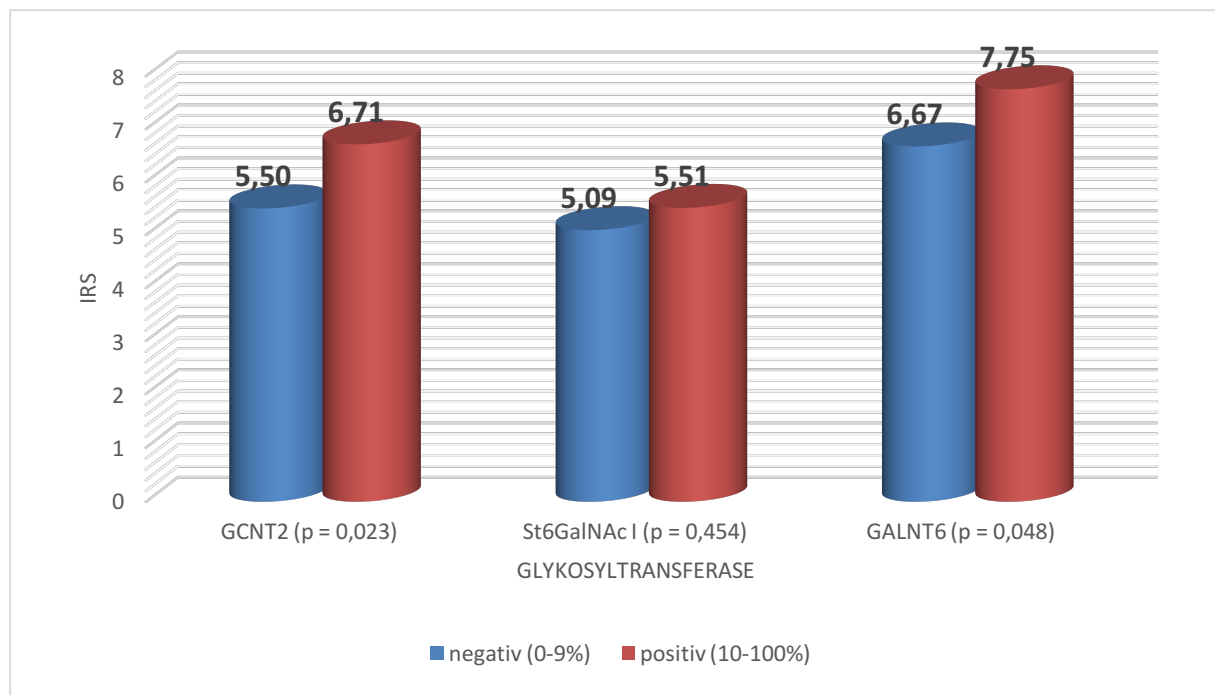


Abb. 34: Abhängigkeit der IRS vom Östrogenrezeptorstatus

4.1.6.2 Progesteronrezeptorstatus

Für den Progesteronrezeptorstatus konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie beim Östrogenrezeptorstatus. Auch hier lag der Mittelwert des IRS bei PR-positiven Tumoren höher. Jedoch waren die Unterschiede schwächer ausgeprägt und erreichten damit für keine der Glykosyltransferasen statistische Signifikanz ($p = 0,115$ für GCNT2, $p = 0,179$ für St6GalNAc I und $p = 0,058$ für GALNT6).

PR-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ (0-9%)</i>	67	6,09	0	12	35,3%	2,948
<i>positiv (10-100%)</i>	123	6,79	0	12	64,7%	2,881
<i>Gesamtsumme</i>	190	6,54	0	12	100,0%	2,916

Tab. 33: GCNT2, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus

PR-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ</i> (0-9%)	68	4,94	0	12	36,4%	3,753
<i>positiv</i> (10-100%)	119	5,66	0	12	63,6%	3,611
<i>Gesamtsumme</i>	187	5,40	0	12	100,0%	3,670

Tab. 34: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus

PR-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ</i> (0-9%)	64	7,03	1	12	34,6%	2,475
<i>positiv</i> (10-100%)	121	7,87	2	12	65,4%	2,714
<i>Gesamtsumme</i>	185	7,58	1	12	100,0%	2,657

Tab. 35: GALNT6, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus

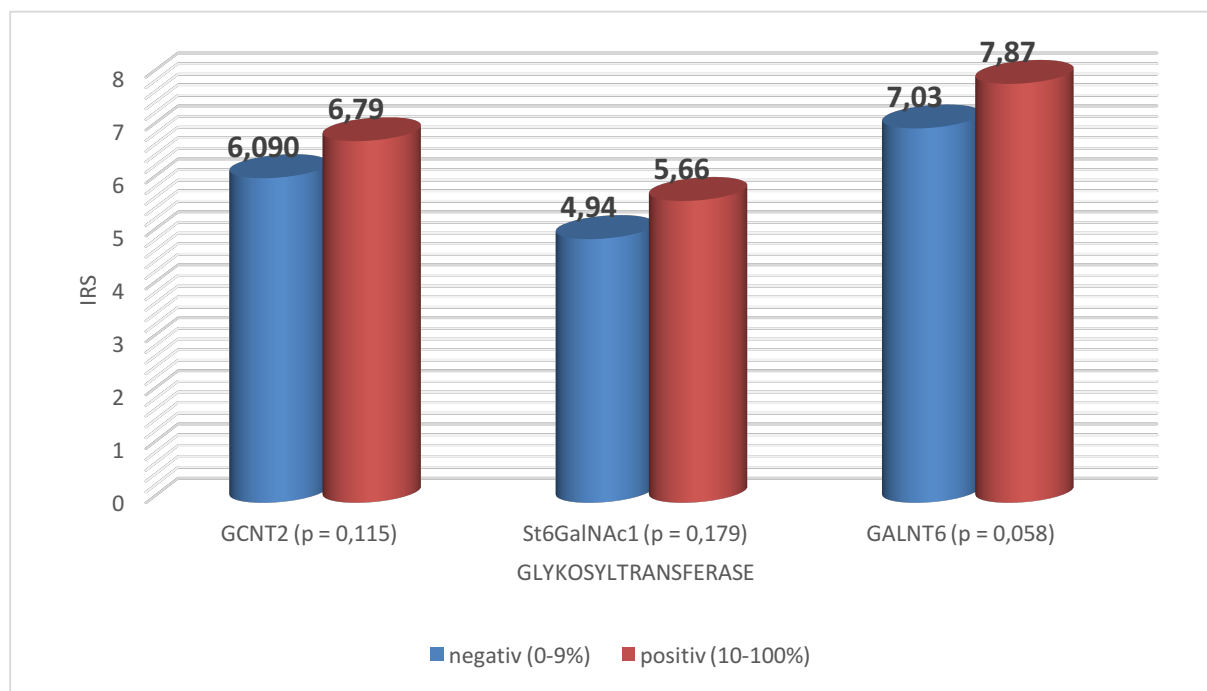


Abb. 35: Abhängigkeit der IRS vom Progesteronrezeptorstatus

4.1.7 Her2-Status

Zur Beurteilung einer möglichen Korrelation zwischen dem Her2-Status und der Ausbildung der untersuchten Glykosyltransferasen wurden anhand des immunhistochemisch bestimmten Her2-Scores zwei Gruppen gebildet. Tumoren mit einem Her2-Score von 0 oder 1 bildeten hierbei die Negativgruppe; die Positivgruppe bestand aus Tumoren mit einem Her2-Score von 3. Auch wenn für alle Enzyme ein durchschnittlich höherer IRS in der Positivgruppe im Vergleich zur Negativgruppe gezeigt werden konnte, konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,883$ für GCNT2, $p = 0,279$ für St6GalNAc I und $p = 0,313$ für GALNT6).

Her2-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ</i> (Score 0 oder 1)	165	6,48	0	12	89,2%	2,808
<i>positiv</i> (Score 3)	20	6,70	3	12	10,8%	3,045
<i>Gesamtsumme</i>	185	6,51	0	12	100,0%	2,827

Tab. 36: GCNT2, IRS abhängig vom Her2-Status

Her2-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ</i> (Score 0 oder 1)	166	5,29	0	12	88,8%	3,559
<i>positiv</i> (Score 3)	21	6,14	0	12	11,2%	3,366
<i>Gesamtsumme</i>	187	5,39	0	12	100,0%	3,540

Tab. 37: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Her2-Status

Her2-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standardabweichung
<i>negativ</i> (Score 0 oder 1)	163	7,37	2	12	88,6%	2,477
<i>positiv</i> (Score 3)	21	8,00	4	12	11,4%	2,828
<i>Gesamtsumme</i>	184	7,45	2	12	100,0%	2,519

Tab. 38: GALNT6, IRS abhängig vom Her2-Status

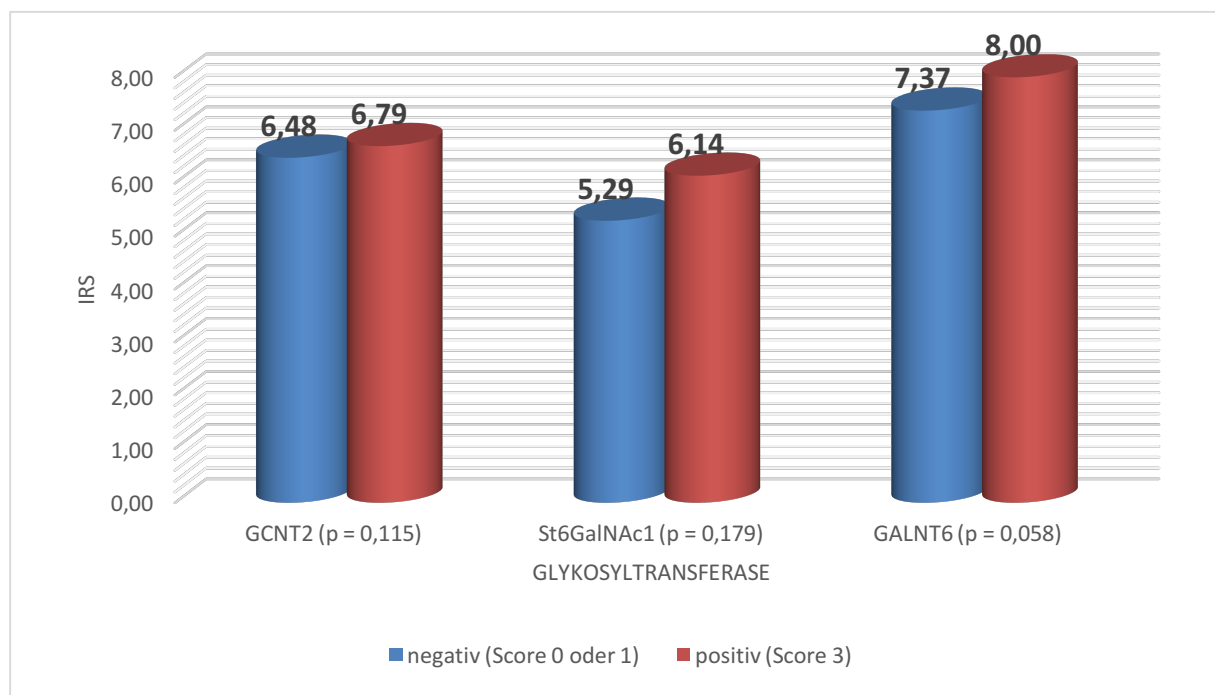


Abb. 36: Abhängigkeit der IRS vom Her2-Status

4.1.8 Her4- und pHer4-Status

Für die Analyse der Abhängigkeit der Enzymexpression vom Her4- beziehungsweise pHer4-Status wurden zwei Gruppen gebildet. Dabei wurden Tumoren, deren Schnitte für ihre Anfärbung von Her4 beziehungsweise pHer4 mit einem IRS von 0 bis 3 bewertet worden waren, zusammengefasst und mit denen verglichen, deren IRS zwischen 4 und 12 lag.

Da der Immunreaktive Score, der hier jeweils für den Her4- beziehungsweise pHer4-Status einerseits und für die Glykosylierungsenzyme andererseits vorlag, zu den Intervallskalen gezählt werden kann, war weiterhin eine nicht parametrische Korrelationsberechnung nach Spearman für Her4 sinnvoll durchführbar.

4.1.8.1 Her4-Status

Es war ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Her4-Status und der Expression aller drei Glykosylierungsenzyme zu sehen. Dies zeigte sich zum einen bei dem Gruppenvergleich, wo die Tumoren, deren IRS für Her4 zwischen 4 und 12 lag, eine deutlich stärkere Anfärbung der Glykosyltransferasen vorwies als solche mit einem IRS für Her4 von 0 bis 3. Dieser Unterschied erreichte für alle drei Enzyme statistische Signifikanz ($p = 0,005$ für GCNT2, $p = 0,001$ für St6GalNAc I und $p = 0,003$ für GALNT6).

Des Weiteren zeigte sich mit den Korrelationskoeffizienten von $r = 0,258$ für GCNT, $r = 0,288$ für St6GalNAc I und $r = 0,233$ eine positive Korrelation zwischen dem Her4-Status und der Ausprägung der Glykosylierungsenzyme. Für die Korrelationen wurde jeweils statistische Signifikanz mit $p < 0,001$ erreicht.

Her4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	134	6,03	0	12	59,3%	2,863
<i>IRS = 4 bis 12</i>	92	7,20	1	12	40,7%	2,876
<i>Gesamtsumme</i>	226	6,50	0	12	100,0%	2,919

Tab. 39: GCNT2, IRS abhängig vom Her4-Status

Her4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	135	4,83	0	12	60,3%	3,609
<i>IRS = 4 bis 12</i>	89	6,39	0	12	39,7%	3,360
<i>Gesamtsumme</i>	224	5,45	0	12	100,0%	3,587

Tab. 40: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Her4-Status

Her4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	133	7,08	1	12	59,9%	2,542
<i>IRS = 4 bis 12</i>	89	8,15	3	12	40,1%	2,512
<i>Gesamtsumme</i>	222	7,50	1	12	100,0%	2,579

Tab. 41: GALNT6, IRS abhängig vom Her4-Status

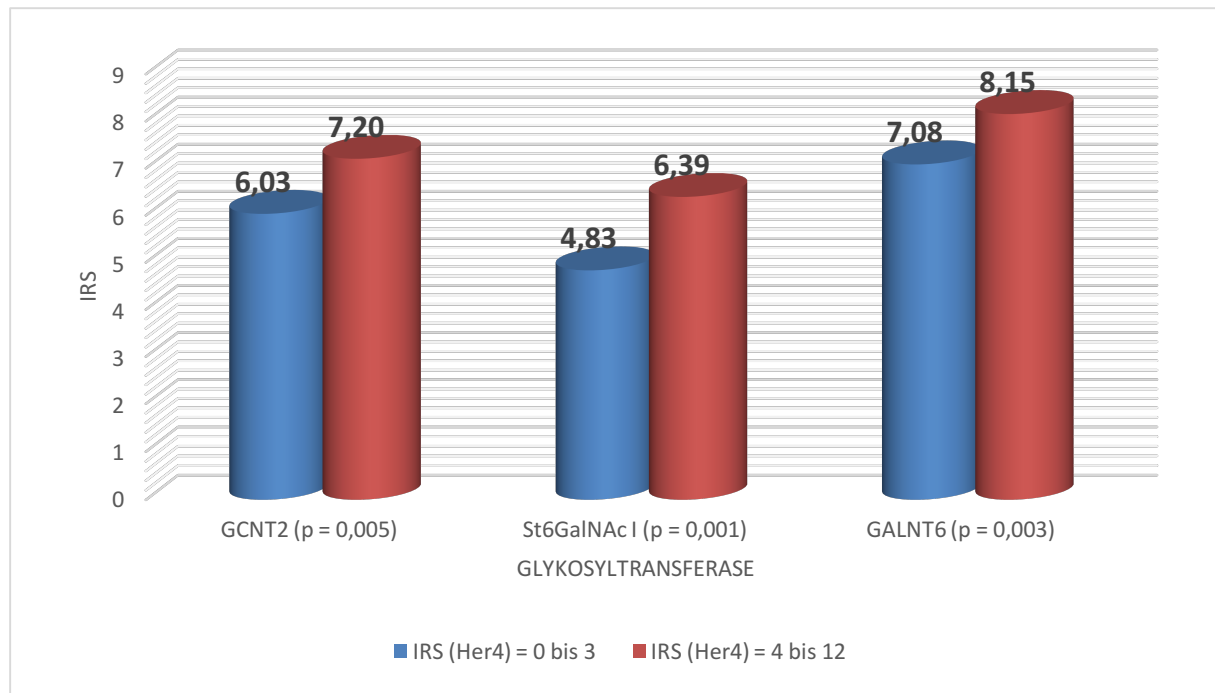


Abb. 37: Abhängigkeit der IRS vom Her4-Status

4.1.8.2 pHer4-Status

Im Gegensatz zu Her4 war bei der phosphorylierten Form pHer4 kein einheitlicher Zusammenhang zur Ausprägungsstärke der Glykosyltransferasen erkennbar. GCNT2 und St6GalNAc I waren bei Tumoren mit einem IRS für pHer4 von 4 bis 12 stärker ausgeprägt als bei Tumoren mit einem IRS von 0 bis 3. Dies zeigte sich für St6GalNAc I statistisch signifikant ($p = 0,039$), für GCNT2 wurde eine Signifikanz nicht erreicht ($p = 0,113$). Für GALNT6 war das Verhältnis umgekehrt. Hier waren solche Tumoren stärker angefärbt, deren IRS für pHer4 in dem Bereich von 0 bis 3 lag. Dieser Unterschied war jedoch mit einem p-Wert von 0,622 weit entfernt von statistischer Signifikanz.

pHer4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	115	6,19	0	12	50,7%	3,114
<i>IRS = 4 bis 12</i>	112	6,79	1	12	49,3%	2,703
<i>Gesamtsumme</i>	227	6,48	0	12	100,0%	2,927

Tab. 42: GCNT2, IRS abhängig vom pHer4-Status

pHer4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	114	4,97	0	12	50,9%	3,483
<i>IRS = 4 bis 12</i>	110	6,04	0	12	49,1%	3,667
<i>Gesamtsumme</i>	224	5,50	0	12	100,0%	3,606

Tab. 43: St6GalNAc I, IRS abhängig vom pHer4-Status

pHer4-Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard-abweichung
<i>IRS = 0 bis 3</i>	111	7,60	1	12	50,2%	2,800
<i>IRS = 4 bis 12</i>	110	7,44	4	12	49,8%	2,333
<i>Gesamtsumme</i>	221	7,52	1	12	100,0%	2,574

Tab. 44: GALNT6, IRS abhängig vom pHer4-Status

4.1.9 Überleben

Aus den Kaplan-Meier-Kurven wurde ersichtlich, dass offenbar kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Glykosyltransferasen GCNT2, St6GalNAc I und GALNT6 und dem OAS der Patientinnen besteht. Hierzu wurden zwei Gruppen gebildet, wobei der Cut-off nach einem IRS von 7 gesetzt wurde.

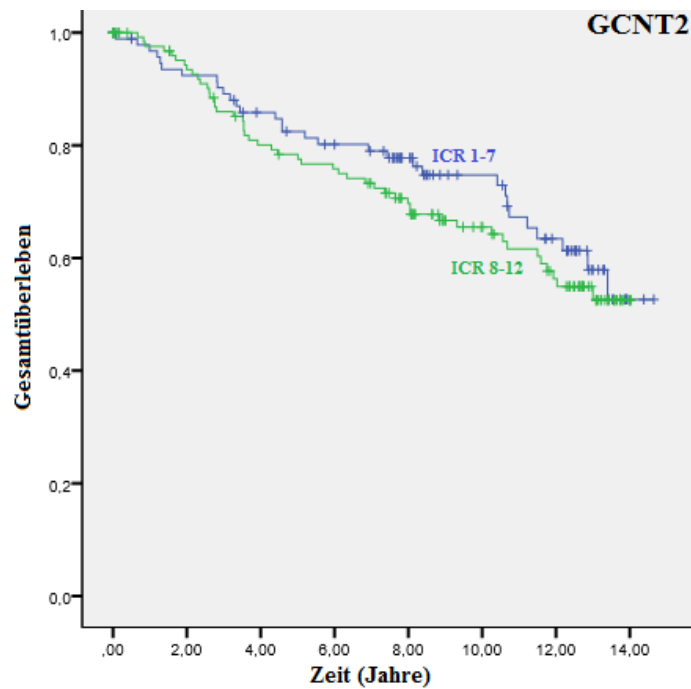


Abb. 38: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von GCNT2

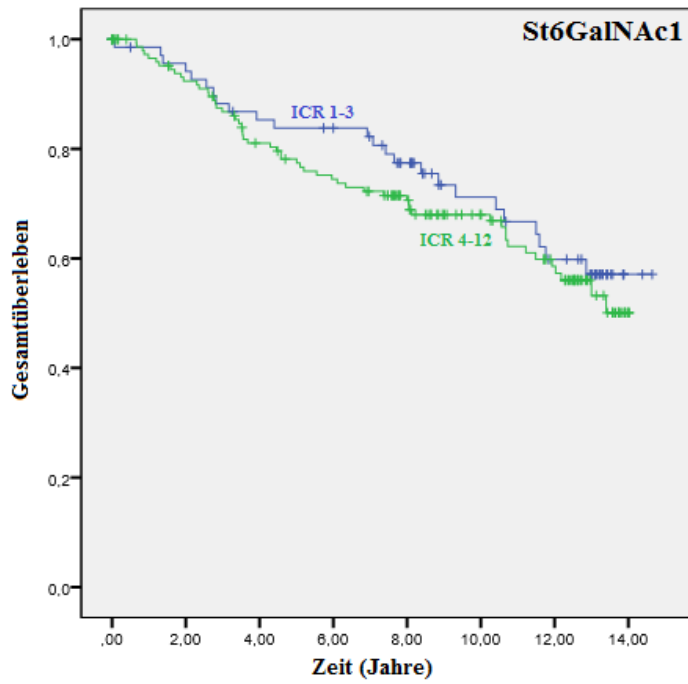


Abb. 39: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von St6GalNAc I

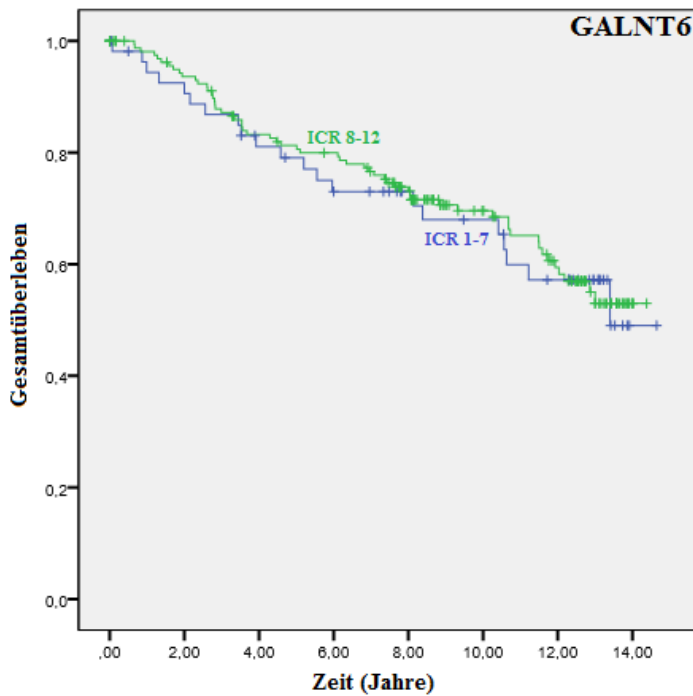


Abb. 40: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von GALNT6

4.2 Vergleich von Primärtumor und dessen Absiedlungen (Kollektiv 2)

Da bei der Untersuchung des Kollektivs 1 für GALNT6 die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, bot es sich an, dieses Glykosylierungsenzym noch weiter zu untersuchen. Hierzu wurden die Tumoren abhängig von ihrer Aggressivität in Form von Metastasen (M) und Rezidiven (R) in fünf Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen. Zudem wurden ebenfalls die Gewebe der Rezidive und der Metastasen angefärbt und bewertet. Dabei zeigte sich für die Carcinoma-in-situ-Präparate die im Durchschnitt stärkste immunhistochemische Anfärbung von GALNT6; der IRS lag hier im Mittel bei 8,00. Die zweitstärkste Anfärbung wies das Gewebe der Fremdmetastasen mit einem IRS-Mittel von 7,63 auf. Die geringste GALNT6-Expression war bei den Mammakarzinomen ohne jegliche Metastasierung zu verzeichnen; hier lag der IRS im Durchschnitt bei 4,00.

N-, M- & R- Status	N	Mittelwert (IRS)	Minimum (IRS)	Maximum (IRS)	% der Gesamtzahl	Standard- abweichung
<i>Cis</i>	7	8,00	4	12	10,3%	2,309
<i>MammaCa N-, M-, R- negativ</i>	7	4,00	4	4	10,3%	0,000
<i>MammaCa N-positiv</i>	10	6,80	0	12	14,7%	3,795
<i>Positiver Lymphknoten</i>	10	6,00	0	8	14,7%	2,828
<i>MammaCa mit Rezidiv</i>	10	4,80	1	12	14,7%	3,458
<i>Rezidiv</i>	9	4,89	1	12	13,2%	3,219
<i>MammaCa M-positiv</i>	7	5,71	2	12	10,3%	3,684
<i>Fernmetastase</i>	8	7,63	1	12	11,8%	4,274
<i>Gesamt- summe</i>	69	5,96	0	12	100,0%	3,330

Tab. 45: GALNT6 Kollektiv 2

Für den statistischen Vergleich wurde aus all solchen Tumoren, die bereits entweder eine Lymphknoten- oder Fernmetastase oder aber eine Rezidiv vorwiesen, eine Subgruppe (MammaCa⁺) gebildet. Der IRS lag bei dieser Gruppe im Durchschnitt bei 5,78. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnte ein p-Wert von 0,077 ermittelt werden, wenn man der MammaCa⁺-Subgruppe die Gruppe der Carcinomata-in-situ zu einen und die Mammakarzinome ohne Metastasen oder Rezidive (MammaCa⁰) zum anderen gegenüberstellte. Damit lag zwar keine statistische Signifikanz vor, aber ein Wert im aussagekräftigen Bereich. Verkleinerte man die MammaCa⁺-Gruppe auf lediglich Mammakarzinome mit einem positiven Nodalstatus, konnte mit einem p-Wert von 0,020 sogar eine statistische Signifikanz erreicht werden.

Da zu dem jeweiligen Mammakarzinom-Präparat ein Gewebeschnitt der dazugehörigen Metastase beziehungsweise des entsprechenden Rezidivs vorlag, konnte auch ein Vergleich der GALNT6-Expression im Primärtumor mit der Expression im Sekundärtumor beziehungsweise –gewebe durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich, dass sich die IRS-Werte für zusammengehörige Schnitte zum größten Teil gleich waren oder nur geringe Abweichungen aufwiesen (**Tab. 46**). Dies spiegelte sich auch in den durchschnittlichen IRS-Werten wider. So lag der mittlere IRS für N-positive Tumoren bei 6,80 und bei 6,00 für deren Lymphknotenmetastasen. Noch ähnlicher in ihrer GALNT6-Expression waren sich Mammakarzinome mit ihren Rezidiven; die Primärtumoren wiesen hier einen durchschnittlichen IRS von 4,80 auf, verglichen mit einem IRS von 4,89 für die Rezidive.

Präparate	IRS des Primärtumors	IRS der Metastase/ des Rezidivs	Abweichung der zusammengehörigen IRS
<i>N-positive Tumoren & deren Lymphknoten</i>			
#01	4	n.a.	n.a.
#02	4	4	0
#03	12	8	4
#04	8	8	0
#05	4	4	0
#06	12	8	4
#07	8	8	0
#08	0	4	4
#09	8	8	0
#10	8	8	0
<i>R-positive Tumoren & deren Rezidive</i>			
#01	2	4	2
#02	12	12	0
#03	3	n.a.	n.a.
#04	2	1	1
#05	8	3	5
#06	8	4	4
#07	4	4	0
#08	4	8	4
#09	1	4	3
#10	4	4	0
<i>M-positive Tumoren & deren Fernmetastasen</i>			
#01	3	4	1
#02	4	12	8
#03	2	4	2
#04	8	8	0
#05	12	12	0
#06	n.a.	12	n.a.
#07	3	1	2
#08	8	8	0

Tab. 46: Vergleich der IRS für zusammengehörige Schnitte (n.a. = nichts auswertbar)

5 Diskussion

Eine detaillierte Charakterisierung des Mammakarzinoms ist für die Behandlung und Therapieerfolg von ausschlaggebender Bedeutung. Es existiert bereits eine Vielzahl von Markern, die zur Beschreibung und Klassifikation des Tumors dienen. Ein weiterer Ansatzpunkt dafür ist die Betrachtung der Glykosylierung von Oberflächenmolekülen. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist hierzu eine schnelle und kostengünstige Methode gegeben.

5.1 Kollektiv 1: Glykosyltransferasen und ihre Bedeutung für die Tumorcharakterisierung

Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden zunächst 235 Gewebeproben von Mammakarzinomen immunhistochemisch gegen die Glykosyltransferasen GCNT2, St6GalNAc I und GALT6 gefärbt und anschließend mittels Lichtmikroskopie der Immunreaktive Score (IRS) als Produkt aus Färbeintensität und Anteil der gefärbten Zellen bestimmt. Der IRS wurde im nächsten Schritt dazu benutzt, die Enzymexpression mit bereits bekannten Tumorcharakteristika wie Tumorstaging und –grading, sowie Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status in ein Verhältnis zu bringen, um gegebenenfalls potenzielle Korrelationen aufzudecken. Hierbei wurde kein Zusammenhang zwischen dem histologischen Subtyp und der Expression der genannten Glykosyltransferasen ersichtlich. Auch Nodal- und Metastasenstatus zeigten keine eindeutige Korrelation zum Auftreten dieser Enzyme. Im Gegensatz dazu fiel bei Betrachtung des Tumorgradings auf, dass GALNT6 in Tumoren niederen Gradings (Grad 1 und 2) signifikant stärker exprimiert wird im Vergleich zu entdifferenzierten Tumoren (Grad 3). Gleiches konnte für GCNT2 und St6GalNAc I beobachtet werden, jedoch ohne dass eine statistische Signifikanz erreicht wurde. Die beschriebenen Ergebnisse lassen nahelegen, dass gut differenzierte Tumoren offenbar stärker auf Glykosyltransferasen angewiesen sind als Tumoren höheren Grades. Entdifferenzierte Karzinome zeichnen sich durch ausgeprägte Veränderungen in ihrer zellulären Struktur aus, was ihnen möglicherweise eine größere Unabhängigkeit von Glykosyltransferasen erlaubt. Bei Gegenüberstellung von Enzymexpression und Tumorgroße zeigte sich eine ähnliche Tendenz. So war der IRS für kleinere Tumoren (Cis und T1) durchschnittlich höher als bei Tumoren größeren Ausmaßes (T2 und T3), wobei auch hier für GALNT6 statistische Signifikanz, für die anderen beiden

Enzyme p-Werte im aussagekräftigen Bereich erreicht wurden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine veränderte Glykosylierung eine wichtige Modifikation in der frühen Phase der Tumorgenese darstellt. Insbesondere GALNT6 scheint eine bedeutende Rolle in der frühen Tumorentwicklung zu spielen, wie schon von *Berois et al.* beschrieben (73). Eine erhöhte Expression von GALNT6 zeigte sich im Besonderen bei kleinen Tumoren hoher Differenzierung, wohingegen GCNT2 und St6GalNAc I stärker in bereits metastasierten Karzinomen ausgebildet werden, was ebenfalls im Einklang mit früheren Ergebnissen steht (79). Weiterhin wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Glykosyltransferasen und Her4 beziehungsweise pHer4 untersucht. Als Mitglied der Familie der EGFR (epidermal growth factor receptors) handelt es sich bei Her4 um eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Nach Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors kommt es zur Dimerisierung und Aktivierung der intrinsischen Kinase des Rezeptors durch Autophosphorylierung (93). Es konnte eine starke Korrelation zwischen der Ausbildung aller drei Glykosyltransferasen und der Expression der „inaktiven“, nicht-phosphorylierten Form von Her4 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu fand sich lediglich für St6GalNAc I eine signifikante Korrelation zwischen Enzymexpression und der „aktiven“, phosphorylierten Form von Her4 (pHer4). Im Weiteren konnte keine signifikante Korrelation weder zwischen dem Her2-, noch dem Hormonrezeptorstatus und dem Vorliegen der Glykosylierungsenzyme gezeigt werden. Als Letztes wurde die Expression der Glykosyltransferasen dem Gesamtüberleben gegenübergestellt; eine statistisch signifikante Korrelation konnte dabei jedoch nicht aufgezeigt werden.

Alle Beobachtungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen früher Tumorgenese und gesteigerter Expression von Glykosyltransferasen hin. Es ist bekannt, dass eine veränderte Oberflächenglykosylierung maligne Zellen vor der Erkennung durch das Immunsystem bewahren kann (94). Insbesondere kleine und frisch entstandene Tumoren neigen dazu, sich der Überwachung durch Immunzellen zu entziehen, um ihr Wachstum und ein unterstützendes Umgebungsmilieu zu gewährleisten. Dadurch ließe sich eine verstärkte Expression von Glykosyltransferasen als früher Schritt der Tumorgenese erklären.

Ein interessanter Fokus könnte darin liegen, die Wechselbeziehung zwischen Her4 beziehungsweise pHer4 und Glykosylierungsmustern genauer zu erforschen. Es ist bereits bekannt, dass Her4 weitestgehend glykosyliert vorliegt (95), womit es in

Kombination mit GALNT6 dazu dienen könnte, Start- und Endpunkt der Glykosylierungskaskade zu identifizieren. Sobald Her4 durch Autophosphorylierung aktiviert ist, werden intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt, die zu einer Entdifferenzierung der Tumorzellen führen. Letztendlich kann diese Kette von Ereignissen in einer Reduktion der Glykosylierung enden (95). Interessanterweise existieren sehr widersprüchliche Aussagen darüber, wie sich eine Her4-Überexpression durch die Karzinomzellen prognostisch auswirkt. *Kew et al.* konnten zeigen, dass im Gegensatz zu Her2 eine fehlende oder nur geringe Ausbildung insbesondere bei gering differenzierten Tumoren anzutreffen ist, folglich Marker einer schlechteren Prognose sein könnte (96). In einer anderen Studie war hingegen ein schlechteres klinisches Outcome für Patientinnen mit starker Ausbildung von Her4 zu beobachten (97). Hier sind demnach weitere Nachforschungen erforderlich. Es ist daneben zu untersuchen, inwieweit sich eine Korrelation von Her4 zu anderen Tumorcharakteristika auf die Expression von Glykosyltransferasen übertragen lässt, im Besonderen die Ausbildung in Tumoren kleinerer Ausdehnung und guter Differenzierung. In diesem Zusammenhang sollte im Speziellen das Enzym St6GalNAc I weiter untersucht werden, da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insbesondere bei dieser Glykosyltransferase eine Korrelation zu pHer4 und Her4 aufzeigen.

5.2 Kollektiv 2: GALNT6 – Vergleich von Primärtumor- mit Metastasen- bzw. Rezidivgewebe

Von den drei untersuchten Glykosyltransferasen erwies sich die Expression von GALNT6 als am aussagekräftigsten bezüglich einer Korrelation zu Tumorgroße und -grading. Als Katalysator einer frühen Reaktion der O-Glykosylierung (73) spielt GALNT6 eine zentrale Rolle und kommt als potenzieller Tumormarker in Frage. Hierzu wurden im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit weitere Untersuchungen an einem zweiten Kollektiv durchgeführt. Dieses Kollektiv bestand aus Gewebeproben von 44 Patientinnen, die alle wegen eines primären Mammakarzinoms operativ behandelt und anschließend für mindestens acht Jahre mit Hilfe eines Nachsorgeprogramms kontrolliert worden waren. Das Kollektiv wurde anhand des Vorhandenseins von Rezidiven, Lymphknoten- oder Fernmetastasen in verschiedene Gruppen unterteilt. Zudem lag jeweils eine Probe des Rezidiv- beziehungsweise Metastasengewebes vor. Auch wenn sich nach immunhistochemischer Färbung keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von GALNT6 und dem TNM-Stadium, der Histologie und dem Hormonrezeptor- und Her2-Status gezeigt werden konnte, war immerhin ein Zusammenhang zwischen Expression des Enzyms und dem Tumorentwicklungsstadium sowie der Metastasenbildung erkennbar. So ließ sich bei den Carcinomata in situ die im Durchschnitt stärkste immunhistochemische Anfärbung nachweisen, gefolgt von den nodalpositiven Mammakarzinomen. Zudem fiel auf, dass das Metastasengewebe ebenfalls eine starke Enzymexpression aufwies. Eine mögliche Erklärung dafür könnte lauten, dass auch hier ein zunächst kleinerer Tumorzellverband vorliegt, der sich insbesondere in seiner frühen Entwicklungsphase durch Modifizierung seiner Oberflächenglykosylierung der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen versucht. Für aussagekräftige Ergebnisse sind hier jedoch Untersuchungen an größeren Panels von Nöten.

Bei Vergleich der GALNT6-Expression im Primärtumor mit derer im Metastasen- beziehungsweise Rezidivgewebe zeigte sich, dass die IRS-Werte der jeweils zusammengehörigen Schnitte zum größten Teil gleich waren oder nur geringe Abweichungen aufwiesen. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Tumorzellen ihre veränderte Oberflächenglykosylierung auch bei Verlassen des Primärverbands beibehalten.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, legen nahe, dass sich Glykosyltransferasen zur erweiterten Charakterisierung von Tumoren eignen, da sie eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung zu spielen scheinen. Folglich könnten sie sich als nützliche Biomarker bei der Analyse von Tumorgewebe erweisen und sowohl prognostische als auch durch weitere Untersuchungen untermauert prädiktive Hinweise geben. Zudem könnten sie als potenzielle therapeutische Angriffspunkte dienen und somit zu einer noch stärkeren Individualisierung der Therapie führen, um bestenfalls Nebenwirkungen der Behandlung so gering wie möglich zu halten bei gleichzeitiger Steigerung der Therapieeffizienz. Die Immunhistochemie stellt in diesem Rahmen eine schnelle und kosteneffiziente Methode dar, die somit eine weitverbreitete Durchführbarkeit gewährleisten könnte.

In Zukunft sollte angestrebt werden, noch weitere Glykosyltransferasen und ihre Rolle bei der Tumorausbildung und –entwicklung zu charakterisieren. Das Ziel sollte darin liegen, die Veränderung der Glykosylierung in ihre verschiedenen Abschnitte zu gliedern, um genau definieren zu können, welche davon für Tumorgenese und Schutz vor dem Immunsystem verantwortlich sind. Ziel der nächsten Jahre wird es sein, die gewonnen Erkenntnisse nicht nur bei Subgruppen des Mammakarzinoms weiter zu untersuchen, sondern die Forschungsansätze auch bei weiteren gynäkologischen Tumoren wie dem Ovarial- oder Endometriumkarzinom anzuwenden, um einen noch detaillierteren Einblick in die Tumorentstehung zu erlangen.

6 Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau; jede achte Frau erleidet im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom. Obwohl die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland eine steigende Tendenz zeigt, nimmt die Mortalität seit 1990 deutlich ab. Dieser Rückgang ist wohl in erster Linie der ausgebauten Brustkrebsvorsorge und den erweiterten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu verdanken. Dennoch stellt das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache dar. Umso wichtiger ist es, immer wieder nach neuen Ansatzpunkten zur Charakterisierung von Malignomen zu suchen, um ein noch detaillierteres Wissen über die Tumorentstehung und –entwicklung auszuarbeiten und letztendlich bestenfalls daraus neue therapeutische Angriffspunkte abzuleiten.

So beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Zusammenhang zwischen Glykosyltransferasen und bereits etablierten Merkmalen zur Tumorcharakterisierung. Bei der Glykosylierung handelt es sich um die häufigste posttranslationale Modifizierung von Proteinen und Lipiden. Sowohl inter- als auch intrazelluläre Prozesse, wie Kommunikation, Zelladhäsion und Zellerkennung durch das Immunsystem werden dadurch beeinflusst. In Tumorzellen wurden bereits veränderte Glykosylierungsmuster beschrieben und mit einer schlechteren Gesamtprognose in Verbindung gebracht. Sowohl regelrechte als auch veränderte Kohlenhydratketten werden durch Glykosyltransferasen auf ihre Akzeptoren übertragen. Somit führt eine Alternation in der Expression dieser Enzyme zu Veränderungen der Glykosylierung von Zelloberflächenmolekülen, wie sie unter anderem während der Zelldifferenzierung und im Rahmen onkogenetischer Transformation zu finden sind. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden drei dieser Glykosylierungsenzyme, GCNT2, St6GalNAc I und GALNT6, gewählt und mit Hilfe der Immunhistochemie zunächst an 235 in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomschnitten angefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch eine Antikörper-gekoppelte Enzymreaktion. Anschließend wurde die Färbung unter dem Lichtmikroskop nach dem immunreaktiven Score (IRS) bewertet. Für alle drei Glykosyltransferasen zeigte sich dabei eine teilweise signifikante Korrelation zwischen Enzymexpression und Tumorgroße, sowie Grad der Tumordifferenzierung. So wiesen vornehmlich Tumoren von geringer Ausdehnung und hoher Differenzierung eine starke Enzymausprägung auf. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zur Her4-, nicht jedoch

zur pHer4-Expression. Die weiteren untersuchten Tumorcharakteristika, wie beispielsweise Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status erbrachten keine ersichtlichen Zusammenhänge mit der Glykosylierung. Da bei der Untersuchung des Kollektivs an reinem Primärtumorgewebe für GALNT6 die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, bot es sich an, dieses Glykosylierungsenzym noch weiter zu untersuchen. Hierzu wurde ein zweites Kollektiv, bestehend aus Gewebeproben von 44 Patientinnen, zusammengestellt, wobei zusätzlich zu den Proben des Primärtumors jeweils Schnitte des zugehörigen Metastasen- beziehungsweise Rezidivgewebes vorlagen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Enzymexpression in den zueinander gehörenden Proben ein sehr ähnliches Ausmaß aufwies. Des Weiteren ließ sich beobachten, dass die Ausbildung von GALNT6 insbesondere in Carcinomata in situ und bereits metastasierten Karzinomen am stärksten ausgeprägt war.

Die Untersuchungen an beiden Kollektiven konnten zeigen, dass sich Glykosyltransferasen dazu eignen, kleine Tumoren mit hoher Differenzierung zu identifizieren. Es kann vermutet werden, dass sich gerade Tumoren in frühen Stadien durch modifizierte Zelloberflächenmoleküle dem Immunsystem zu entziehen versuchen. Glykosylierungsmuster könnten demnach als Marker der frühen Tumorgenese interpretiert werden und als solche Anwendung in der Diagnostik finden, sowie als mögliche Angriffspunkte von Medikamenten auch in der Therapie Einzug halten.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluouracil
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
BIRADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BRCA1/2	BRestCAncer1/2
cDNA	complementary DNA
CIS	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DFS	disease free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
e.V.	eingetragener Verein
FisH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GALNT6	N-Acetylgalaktosaminyltransferase 6
GCNT2	β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 2
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GnRH	Gonadotropin
Her2/4	human epidermal growth factor receptor 2/4
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ILC	invasives lobuläres Karzinom
IRS	Immunreaktiver Score
l	Liter
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LH	luteinisierendes Hormon
LK	Lymphknoten
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein-Kinase

mm	Millimeter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	MutS protein homolog 2
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MUC1	Mucin 1
n.a.	nicht auswertbar
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NBF	neutral buffered formalin
NOS	not otherwise specified
NST	no special type
OAS	overall survival
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	potentia Hydrogenii
PR	Progesteronrezeptor
PTN	Phosphatase and Tensin homolog
RAS	RA _t Sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
SERM	selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
shRNA	Small hairpin RNA
sLe ^x	sialyl-Lewis
SPPS	Statistical Package for the Social Sciences
St6GalNAc I	St6(α-N-Acetylneuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosamin-α-2,6-sialyltransferase I
STK11	Serin-Threonin-Kinase11
sTn	sialyl-Thomsen-noevelle
Tab.	Tabelle
TACA	tumour associated carbohydrate antigens
Tn	Thomsen-noevelle
UDP	Uridindiphosphat
UICC	Union internationale contre la cancer
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
WHO	Weltgesundheitsorganisation

7.2 Bezugsquellenverzeichnis

Reagenzien	Bezugsquelle
Aqua dest.	Apotheke Innenstadt, Uni LMU
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
3,3-Diaminobenzidin (DAB) mit Substratpuffer	Dako North America, Inc., Carpinteria (USA)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 50% vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU
Ethanol 70% vergällt	CLN GmbH § Chemikalien- & Laborgroßhandel, Langenbach
Ethanol 96% p.a.	Apotheke Innenstadt, Uni LMU
Ethanol absolut vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämalan	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG) – Goat-Normalserum – biotinyliertes Goat-Anti-Rabbit-IgG-Sekundär-AK – konzentrierte A- & B-Reagenzien	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxid 30%	VWR International, Radnor (USA)
X-tra Kitt	Medite GmbH, Burgdorf
Xylol	Apotheke Innenstadt, Uni LMU

Gebrauchs- & Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser 24x24 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Eppendorf Research Pipetten – 0,5-10 µl – 10-100 µl – 500-5.000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Diaplan – Objektiv 6,3-fach – Objektiv 10-fach – Objektiv 25-fach – Objektiv 40-fach	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Objektträger Superfrost Plus 26x76x1 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen epT.I.P.S 500µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Premium Tips – 10 µl – 100 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Schnellkochtopf	Fissler GmbH, Idar-Oberstein
serologische Pipetten Falcon, steril – 5 ml – 10 ml	BD, Franklin Lakes (USA)
Vortex-Gerät Genie 2	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz)

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die aktuelle WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome (<u>adaptiert nach:</u> Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. <i>WHO classification of tumours of the breast</i> . Lyon: IARC Press; 2012.....	9
Tab. 2: TNM-Klassifikation von Tumoren (<u>adaptiert nach:</u> Sobin LH, Wittekind C. <i>TNM Classification of Malignant Tumours</i> . 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken; 2002.).....	14
Tab. 3: UICC-Stadieneinteilung (<u>adaptiert nach:</u> Sobin LH, Wittekind C. <i>TNM Classification of Malignant Tumours</i> . 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken; 2002.).....	14
Tab. 4: Verteilung der histologischen Subtypen.....	33
Tab. 5: Verteilung der Differenzierungsgrade.....	34
Tab. 6: Verteilung der Tumorausdehnungen.....	34
Tab. 7: Verteilung des Nodalstatus	35
Tab. 8: Verteilung des Metastasenstatus	35
Tab. 9: Verteilung des Östrogenrezeptorstatus.....	36
Tab. 10: Verteilung des Progesteronrezeptorstatus	36
Tab. 11: Verteilung des Her4-Status	37
Tab. 12: Verteilung des pHer4-Status.....	37
Tab. 13: Zusammensetzung des Kollektivs 2.....	38
Tab. 14: Informationen zu den verwendeten Antikörpern.....	39
Tab. 15: GCNT2, IRS abhängig von der Histologie	53
Tab. 16: St6GalNAc I, IRS abhängig von der Histologie.....	54
Tab. 17: GALNT6, IRS abhängig von der Histologie.....	54
Tab. 18: GCNT2, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad	55
Tab. 19: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad	55
Tab. 20: GALNT6, IRS abhängig vom Differenzierungsgrad	56
Tab. 21: GCNT2, IRS abhängig von der Tumorausdehnung	57
Tab. 22: St6GalNAc I, IRS abhängig von der Tumorausdehnung.....	57
Tab. 23: GALNT6, IRS abhängig von der Tumorausdehnung	58
Tab. 24: GCNT2, IRS abhängig vom Nodalstatus	59
Tab. 25: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Nodalstatus.....	59
Tab. 26: GALNT6, IRS abhängig vom Nodalstatus.....	59
Tab. 27: GCNT2, IRS abhängig vom Metastasenstatus	60
Tab. 28: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Metastasenstatus.....	60
Tab. 29: GALNT6, IRS abhängig vom Metastasenstatus	60
Tab. 30: GCNT2, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus.....	62

Tab. 31: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus	62
Tab. 32: GALNT6, IRS abhängig vom Östrogenrezeptorstatus	62
Tab. 33: GCNT2, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus	63
Tab. 34: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus	63
Tab. 35: GALNT6, IRS abhängig vom Progesteronrezeptorstatus	64
Tab. 36: GCNT2, IRS abhängig vom Her2-Status	65
Tab. 37: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Her2-Status.....	65
Tab. 38: GALNT6, IRS abhängig vom Her2-Status	66
Tab. 39: GCNT2, IRS abhängig vom Her4-Status	68
Tab. 40: St6GalNAc I, IRS abhängig vom Her4-Status.....	68
Tab. 41: GALNT6, IRS abhängig vom Her4-Status	68
Tab. 42: GCNT2, IRS abhängig vom pHer4-Status	70
Tab. 43: St6GalNAc I, IRS abhängig vom pHer4-Status.....	70
Tab. 44: GALNT6, IRS abhängig vom pHer4-Status	70
Tab. 45: GALNT6 Kollektiv 2.....	73
Tab. 46: Vergleich der IRS für zusammengehörige Schnitte	75

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Invasiv duktales Mammakarzinom (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>)	8
Abb. 2: Lobuläres Mammakarzinom (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>)	8
Abb. 3: Wenig differenziertes invasives duktales Mammakarzinom (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>).....	10
Abb. 4: Wenig differenziertes invasives duktales Mammakarzinom (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>).....	11
Abb. 5: Invasiv lobuläres Mammakarzinom (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>)	12
Abb. 6: Invasiv duktales Mammakarzinom, Her2-Score 2+ (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>)....	16
Abb. 7: Invasiv duktales Mammakarzinom, Her2-Score 3+ (<u>Quelle:</u> © <i>PathoPic</i>)....	16
Abb. 8: Strukturen von typischen O- (a) und N- (b) Glykanen (<u>Quelle:</u> <i>Lodish H, Berk A, Zipursky S. Molecular Cell Biology. 4 ed. New York: W. H. Freeman; 2000.</i>)	23
Abb. 9: ABC-Methode (<u>adaptiert nach:</u> <i>Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. München</i>)	29
Abb. 10: Positivkontrolle GCNT2 (Colon)	45
Abb. 11: Positivkontrolle St6GalNAc I (Uterus)	45
Abb. 12: Positivkontrolle GALNT6 (Plazenta).....	45
Abb. 13: Isotypenkontrolle GCNT2 (Colon)	47
Abb. 14: Isotypenkontrolle St6GalNAc I (Uterus)	47

Abb. 15: Isotypenkontrolle GALNT6 (Plazenta).....	47
Abb. 16: GCNT2 - Färbeintensität 1	48
Abb. 17: GCNT2 - Färbeintensität 2	48
Abb. 18: GCNT2 - Färbeintensität 3	48
Abb. 19: St6GalNAc I - Färbeintensität 1	49
Abb. 20: St6GalNAc I - Färbeintensität 2	49
Abb. 21: St6GalNAc I - Färbeintensität 3	49
Abb. 22: GALNT6 - Färbeintensität 1	50
Abb. 23: GALNT6 - Färbeintensität 2	50
Abb. 24: GALNT6 - Färbeintensität 3	50
Abb. 25: GALNT6 - Tumor mit LK-Metastase	51
Abb. 26: GALNT6 - Gewebe der LK-Metastase	51
Abb. 27: GALNT6 - Tumor mit Fernmetastase	51
Abb. 28: GALNT6 - Gewebe der Fernmetastase.....	51
Abb. 29: GALNT6 - Tumor mit Rezidiv.....	51
Abb. 30: GALNT6 - Gewebe des Rezidivs	51
Abb. 31: Abhängigkeit der IRS vom Differenzierungsgrad	56
Abb. 32: Abhängigkeit der IRS von der Tumorausdehnung	60
Abb. 33: Abhängigkeit der IRS vom Metastasenstatus	61
Abb. 34: Abhängigkeit der IRS vom Östrogenrezeptorstatus.....	63
Abb. 35: Abhängigkeit der IRS vom Progesteronrezeptorstatus	64
Abb. 36: Abhängigkeit der IRS vom Her2-Status	66
Abb. 37: Abhängigkeit der IRS vom Her4-Status	69
Abb. 38: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von GCNT2	71
Abb. 39: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von St6GalNAc I.....	72
Abb. 40: Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben abhängig vom IRS von GALNT6	72

8 Literaturverzeichnis

1. Society AC. The History of Cancer 2014.
2. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin 2013. p. 16-7, 68-71.
3. Lindner C. Mammakarzinom im Wandel. Hamburger Ärzteblatt. 2012;11/2012:12-7.
4. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Berlin: 2010.
5. National Cancer Institute:; Ries LAG, Melbert D, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review 1975-2005. 2008.
6. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12 Reihe 4 2013:[6 p.].
7. Bilimoria MM, Morrow M. The Woman at Increased Risk for Breast Cancer: Evaluation and Management Strategies. CA Cancer J Clin. 1995;45(5):263-78.
8. Kreienberg R, Möbus V, Jonat W, Kühn T. Mammakarzinom interdisziplinär. 4 ed. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag; 2010. 398 p.
9. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. N Engl J Med. 1992;327(5):319-28.
10. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. A J Hum Genet. 2003;72:1117-30.
11. Schwab M, Claas A, Savelyeva L. BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. Cancer Letters. 2002;175(2):1-8.
12. Brewster A, Helzlsouer K. Breast cancer epidemiology, prevention, and early detection. Current Opinion in Oncology. 2001;13(6):420-5.
13. Beral V, Bull D, Pirie K, Reeves G, Peto R. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol. 2012;13(11):1141-51.
14. Beral V, Bull D, Doll R, Key T, Peto R, Reeves G. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. The Lancet. 1997;350(9084):1047-59.

15. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Louise B, Hoover R. Menopausal Estrogen and Estrogen-Progestin Replacement Therapy and Breast Cancer Risk. *JAMA*. 2000;283(4):485-92.
16. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Trichtler DL, Yaffe MJ. Mammographic Densities and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998;7(12):1133-44.
17. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun S-S, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA. Alcohol and Breast Cancer in Women: A Pooled Analysis of Cohort Studies. *JAMA*. 1998;279(7):535-40.
18. Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, Nixon DW, Shapiro A, Hoy MK, et al. Dietary Fat Reduction and Breast Cancer Outcome: Interim Efficacy Results From the Women's Intervention Nutrition Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(24):1767-76.
19. Morabia A, Bernstein M, Héritier S, Khatchatrian N. Relation of Breast Cancer with Passive and Active Exposure to Tobacco Smoke. *American Journal of Epidemiology*. 1996;143(9):918-28.
20. Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical Activity and the Risk of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 1997;336(18):1269-75.
21. Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Benegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, et al. Dietary Fat, Olive Oil Intake and Breast Cancer Risk. *Int J Cancer*. 1994;58(6):774-80.
22. Dietel M, Klöppel G. *Pathologie*. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag; 2013. 819 p.
23. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. *Pathologie*. 4 ed: Urban & Fischer Verlag / Elsevier Verlag; 2008. 1362 p.
24. Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn H-P. Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation. *Der Pathologe*. 2014;35(1):7-17.
25. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. *WHO classification of tumours of the breast*. Lyon: IARC Press; 2012.
26. Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press; 2003. p. 9-112.
27. Rakha EA, El-Sayed ME, Powe DG. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J Cancer*. 2008;44(1):73-83.
28. Pestalozzi BC, Zahrleh D, Mallon E. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3006-14.

29. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM-Atlas. 5 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005. 383 p.
30. Albert U-S. Stufe-3-Leitlinie. Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag; 2008.
31. Sobin LH, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken; 2002.
32. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
33. Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C. Kurzlehrbuch Pathologie. 1 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2010.
34. Hudis CA. Trastuzumab - Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *The New England Journal of Medicine*. 2007;357(1):39-51.
35. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Sci M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in Her2-Positive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1659-72.
36. Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, Hagerty KI, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(1):118-45.
37. Untch M, Harbeck N, Thomssen SD. Colloquium Senologie 2013: Agileum Verlagsgesellschaft 2013.
38. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182:311-22.
39. Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Annual Oncology*. 2006;17(4):597-604.
40. Kiechle M, Paepke S, Schmalfeldt B, Harbeck N, Heywang-Köbrunner S, Neises M. Gynäkologie und Geburtshilfe. 2 ed. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2011. 576 p.
41. Jatoi I, Proschan M. Randomized Trials of Breast-Conserving Therapy Versus Mastectomy for Primary Breast Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*. 2005;28(3):289-94.
42. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-Year Follow-Up of a Randomized Study Comparing Breast-Conserving

Surgery with Radical Mastectomy for Early Breast Cancer. The New England Journal of Medicine. 2002;347(16):1227-32.

43. Fisher B, Anderson S, Redmond C, Wolmark N, Wickerham L, Cronin W. Reanalysis and Results After 12 Years of Follow-Up in a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy with Lumpectomy With or Without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer. The New England Journal of Medicine. 1995;333(22):1456-61.

44. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schultze-Mosgau A, Schneider K-T, Weiss JM. Gynäkologie und Geburtshilfe. 2 ed 2007.

45. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF DKeVuDKeV. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Berlin: 2012.

46. Houssami N, Macaskill P, Marinovich L, Dixon M, Irwig L, Brennan M, et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. European Journal of Cancer. 2010;46(18):3219-32.

47. Stauber M, Weyerstahl T. Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2007.

48. Darby S, MacGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. The Lancet. 2011;378(9804):1707-16.

49. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. The Lancet. 2005;366(9503):2087-106.

50. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2015: Karow; 2014.

51. Heinemann V, Kahlert S, Stemmler H. Multimodale Therapiekonzepte beim metastasierten Mammakarzinom. Der Internist. 2010;51(12):1358-65.

52. Ackermann H, Aden K, Aurich M, Becker G, Centgraf M. Allex - Alles fürs Examen. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2014.

53. Grunfeld E, Noorani H, McGahan L, Paszat L, Coyle D, Walraven Cv, et al. Surveillance mammography after treatment of primary breast cancer: a systematic review. The Breast. 2002;11(3):228-35.

54. Dennis J, Granovsky M, Warren C. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. Biochimica et biophysica acta. 1999;1473(1):21-34.

55. Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspective. *Cancer Research*. 1985;45(6):2405-14.
56. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1473(1):4-8.
57. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010;12(204).
58. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics *BMB Reports*. 2011;44(12):772-81.
59. Lodish H, Berk A, Zipursky S. *Molecular Cell Biology*. 4 ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
60. Hakomori. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyko)lipid metabolism. *Cancer Research*. 1996;56(23):5309-18.
61. Miles DW, Happerfield LC, Smith P, Gillibrand R, Bobrow LG, Gregory WM, et al. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1994;70(6):1272-5.
62. Burchell JM, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2001;6(3):355-64.
63. Lloyd KO, Burchell J, Kudryashov V, Yin BWT, Taylor-Papadimitriou J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines: demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(52):33325-34.
64. Clausen H, Bennett EP. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology*. 1996;6(6):635-46.
65. Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M. Transcriptional regulation of N-acetylglycosaminyltransferase V by the src oncogene. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(31):19575-81.
66. Le Marer N, Laudet V, Svensson EC, Cazlaris H, Van Hille B, Lagrou C, et al. The c-Ha-ras oncogene induces increased expression of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells. *Glycobiology*. 1992;2(1):49-56.
67. Joziase DH. Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure. *Glycobiology*. 1992;2(4):271-7.

68. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: Structure, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*. 2008;77:521-55.
69. Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(30):17615-8.
70. Park J-H, Nishidate T, Kijima K, Ohashi T, Takegawa K, Fujikane T, et al. Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Research*. 2010;70(7):2759-69.
71. Carraway KL, Funes M, Workma HC, Sweeney C. Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Current Topics in Developmental Biology*. 2007;78:1-22.
72. Altschuler Y, Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Apodaca G, Weisz OA, et al. Clathrin-mediated Endocytosis of MUC1 is Modulated by Its Glycosylation State. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(3):819-31.
73. Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, Sastre-Garau X, et al. UDP-N-Acetyl- δ -Galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-6 as a New Immunohistochemical Breast Cancer Marker. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2006;45(3):317-28.
74. Bierhuizen MFA, Mattei M-G, Fukuda M. Expression of the developmental I antigen by a cloned human cDNA encoding a member of a β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family. *Genes & Development*. 1993;7(3):468-78.
75. Magnet AD, Fukuda M. Expression of the large I antigen forming β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in various tissues of adult mice. *Glycobiology*. 1997;7(2):285-95.
76. Yazer MH, Olsson ML, Palcic MM. The cis-AB Blood Group Phenotype: Fundamental Lessons in Glycobiology. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006;20(3):207-17.
77. Burchell J, Wang D, Taylor-Papadimitriou J. Detection of the tumour-associated antigens recognized by the monoclonal antibodies HMFG-1 and 2 in serum from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*. 1984;34:763-8.
78. Dube VE, Kallio P, Chmiel JS, Haid M, Hakim A. An Immunosorbent Assay for Blood Group I Antigens in Breast Carcinoma. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1987;45:196-207.

79. Zhang H, Meng F, Wu S, Kreike B, Sethi S, Chen W, et al. Engagement of I-Braching β -1,6-Acetylglucosaminyltransferase 2 in Breast Cancer Metastasis and TGF- β Signaling. *Cancer Research*. 2011;71(14):4846-56.
80. Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochemistry and cell biology*. 1996;106(2):197-207.
81. Julien S, Krzewinski-Recchi M-A, Harduin-Lepers A, Gouyer V, Huet G, Le Bourhis, et al. Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc α 2,6-sialyltransferase (St6GalNAcI) cDNA. *Glycoconjugate Journal*. 2001;18:883-93.
82. Sewesll R, Bäckström M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, Noll T, et al. The ST6GalNAc-I Sialyltransferase Localizes throughout the Golgi and Is Responsible for the Synthesis of the Tumor-associated Sialyl-Tn O-Glycan in Human Breast Cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2005;281(6):3586-94.
83. Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart A-S, et al. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 2006;16(1):54-64.
84. Coons AH, Jones RN. The demonstration of pneumococcal antigens in tissues by the use of flourescent antibody. *Journal of Immunology*. 1942;45:157-70.
85. Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Wien: Springer-Verlag; 2013.
86. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. München Jena: Urban & Fischer; 2000.
87. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
88. Hallbach J. *Klinische Chemie und Hämatologie*: Georg Thieme Verlag KG; 2011. 2 p.
89. Nowacek JM, Kiernan JA. Chapter 16: Fixation and Tissue Processing2010; 2:[141-52 pp.].
90. Reiche D. *Roche-Lexikon Medizin*. 5 ed. München: Urban & Fischer; 2003.
91. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3 ed: Thieme; 2009. 644 p.
92. Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18 ed: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. 556 p.

93. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004;44:195-217.
94. Madsen CB, Petersen C, Lavrsen K, Harndahl M, Buus S, Clausen H. Cancer Associated Aberrant Protein O-Glycosylation Can Modify Antigen Processing and Immune Response. *PloS ONE [Internet]*. 2012; 7(11):[e50139 p.].
95. Chuu C-P, Chen R-Y, Barkinge JL, Ciaccio MF, Jones RB. System-level analysis of ErbB4 signaling in breast cancer: a laboratory to clinical perspective. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(6):885-91.
96. Kew TY, Bell JA, Pinder SE, Denley H, Srinivasan R, Gullick WJ, et al. e-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2000;82(6):1163-70.
97. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RCF, Angus B. Type 1 growth factor receptr expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;56:300-4.

9 Danksagung

Auch wenn man nicht darum herumkommt seine Dissertation alleine zu schreiben, ist sie doch meist ein Projekt, an dem eine ganze Gruppe von Leuten beteiligt ist, ohne die das Abenteuer „Doktorarbeit“ nur sehr schwer von Erfolg gekrönt worden wäre. So gibt es auch in meinem Fall einige Personen, denen ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte.

So danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvolle projektbegleitende Beratung und Ideenvielfalt.

Ohne meine beiden wissenschaftlichen Betreuer Priv. Doz. Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen und Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl wäre ich wahrscheinlich in der Welt der Wissenschaft völlig untergegangen. Sie hatten stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und standen mir zu jeder Zeit zur Seite. Dafür bin ich sehr dankbar und freue mich, in diesem Rahmen Freunde gefunden zu haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christina Kuhn und Simone Hoffmann für die liebenswerte Unterstützung und Einweisung in die faszinierenden Tiefen der Immunhistochemie bedanken.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen wundervollen Eltern, Wilma und Benno Liesche, die mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht haben, sondern die mich mit viel Geduld und Unterstützung und mit ganzem Herzen während der vergangenen Jahre begleitet haben. Genauso wie ihnen ist auch meinem „kleinen“ Bruder Leopold immer etwas eingefallen, mich aufzumuntern, wenn das Schwesterchen (beziehungsweise Töchterchen) mal wieder verzweifelt zu Hause angerufen hat.

Vielen Dank, ihr Lieben!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Friederike Liesche
Geburtsdatum und -ort: 18. April 1990 in Dessau, jetzt Dessau-Roßlau (Sachsen-Anhalt)

Schul Ausbildung und Studium

1996 – 2008	Grundschule und Liborius-Gymnasium, Dessau
07/2008 – 07/2009	einjähriger Auslandsaufenthalt in Schweden
10/2009 – 09/2011	Medizinstudium (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians Universität (LMU) München
10/2011 – 04/2015	Medizinstudium (Klinik): Technische Universität München
05/2015 – 04/2016	Praktisches Jahr

Praktisches Jahr

05/2015 – 09/2015	Innere Medizin: Städtisches Klinikum Bogenhausen, München
09/2015 - 12/2015	Pathologie: Universitätsklinikum Rechts der Isar, München
12/2015 – 04/2016	Chirurgie: Städtisches Klinikum Bogenhausen, München

Veröffentlichungen

Kölbl, A. C., Hiller, R. A., Ilmer, M., Liesche, F., Heublein, S., Schröder, L., Hutter, S., Friese, K., Jeschke, U., Andergassen, U. "Glycosyltransferases as marker genes for the quantitative polymerase chain reaction-based detection of circulating tumour cells from blood samples of patients with breast cancer undergoing adjuvant therapy". Molecular Medicine Reports 12.2 (2015): 2933-2938.

Andergassen, U., Liesche, F., Kölbl, A. C., Ilmer, M., Hutter, S., Friese, K., Jeschke, U. "Glycosyltransferases as Markers for Early Tumorigenesis," BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 792672, 11 pages, 2015. doi:10.1155/2015/792672

Liesche, F., Kölbl, A. C., Ilmer, M., Hutter, S., Jeschke, U., Andergassen, U. "Role of N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in early tumorigenesis and formation of metastasis". Molecular Medicine Reports 13.5 (2016): 4309-4314.

11 Eidesstattliche Versicherung

Liesche, Friederike

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Glykosyltransferasen als Marker der frühen Tumorgenese –
Immunhistochemische Färbungen an Mammakarzinompräparaten**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13. Juli 2017